

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DEN İHRAÇ EDİLEN *COLCHICUM* TOHUMLARININ
İÇERİĞİNDEKİ KOLŞİSİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Serhat BAYRAK

NİSAN 2014

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DEN İHRAÇ EDİLEN *COLCHICUM* TOHUMLARININ
İÇERİĞİNDEKİ KOLŞİSİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Kimyager Serhat BAYRAK

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Kimya)”**

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.04.2014

Tezin Savunma Tarihi : 06.05.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

TRABZON 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Serhat BAYRAK tarafından hazırlanan

**TÜRKİYE'DEN İHRAÇ EDİLEN *COLCHICUM* TOHUMLARININ
İÇERİĞİNDEKİ KOLŞİSİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 22/04/2014 gün ve 1550 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınav sonunda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ümmühan OCAK

Üye : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Türkiye’den ihraç edilen *Colchicum* tohumlarının içeriğindeki kolşisinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması” adlı bu çalışma Karadeniz teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen, çalışmalarımın başlangıcından bitimine kadar çok değerli bilgi birikimlerini, destek ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın hocam Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’e, HPLC ve SFE analizlerimde yardımda bulunan Ezgi DEMİR’ e, tohumların öğütülmesi için yardımda bulunan Jeoloji Bölümü, Öğretim Üyesi Uzman Erdoğan Timur KAYNAK’ a, tohumlardaki yağın analizi için yardımda bulunan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Arş. Gör. Serap Özer YAMAN’ a, MS analizi için Giresun Üniversitesi, Uzman Elif APAYDIN’ a, laboratuvarlarını kullanmamıza izin veren K.T.Ü Farmakoloji Bölümü öğretim üyelerine, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Gülşah ÇOMOĞLU, İlknur ALTIN, Gönül SERDAR, Melek KOÇ, Cansu ALBAY, İlknur ERKÖSEOĞLU, Gamze KAPUCU, Fatih KAR, Ümit DEMİRBAŞ ve Burak BARUT’ a, bana emeği geçen hocalarıma ve K.T.Ü Kimya Bölüm Başkanlığına, bugünlere gelmemde büyük emeği olan ve beni sürekli destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma 113T023 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Serhat BAYRAK

Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Türkiye’den İhraç Edilen *Colchicum* Tohumlarının İçeriğindeki Kolşisinin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri KTÜ Kimya ve Temel Tıp Bilimleri Farmakoloji Laboratuvarlarında yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 14/04/2014

Serhat BAYRAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
TEZ BEYANNAMESİ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bitkisel Kökenli Biyoaktif Bileşikler.....	3
1.2.1. Glikozitler.....	3
1.2.1.1. Kardiyak Glikozitler.....	4
1.2.1.2. Siyanojenik Glikozitler.....	4
1.2.1.3. Glikosinolatlar.....	4
1.2.1.4. Saponinler.....	4
1.2.1.5. Antrakınon Glikozitleri.....	5
1.2.2. Flavonoidler ve Proantosiyanidinler.....	5
1.2.3. Tanenler.....	5
1.2.4. Mono ve Seski (bir buçuk)-Terpenoidler ve Fenilpropanoidler.....	6
1.2.5. Diterpenoidler.....	6
1.2.6. Reçineler.....	6
1.2.7. Lignanlar.....	7
1.2.8. Alkaloitler.....	7
1.2.8.1. Tropan Alkaloitleri.....	7
1.2.8.2. Pirrolizidin Alkaloitleri.....	7
1.2.8.3. İzokinolin Alkaloitleri.....	8
1.2.8.4. Metilksantin alkaloitleri.....	8
1.2.8.5. Pseudoalkaloitleri.....	8
1.2.9. Furokomarinler ve Nafta diantronlar.....	8
1.2.10. Proteinler ve Peptitler.....	9

1.3.	Biyoaktif Bileşenlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler.....	9
1.3.1.	Soksilet Ekstraksiyonu.....	10
1.3.2.	Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu	11
1.3.3.	Mikrodalga Ekstraksiyonu	12
1.3.4.	Uçucu Bileşenlerin Su Buharı Ekstraksiyonu (Clevenger Yöntemi)	13
1.3.5.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	14
1.3.5.1.	Süperkritik Akışkanların Tanımı	14
1.3.5.2.	Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları	18
1.4.	Bilinen <i>Colchicum</i> Türleri	19
1.4.1.	<i>Colchicum speciosum</i> Steven (Acı Çiğdem).....	21
1.4.2.	Kolşisin	24
1.4.3.	Kolşisin İzolasyonuna Yönelik Literatür Araştırması	27
1.5.	Çalışmanın Amacı.....	30
2.	MATERYAL METOD	32
2.1.	Kullanılan Kimyasallar	32
2.2.	Kullanılan Cihazlar	32
2.3.	DeneySEL Çalışmalar	33
2.3.1.	Tohumların Toplanması ve Öğütülmesi	33
2.3.2.	Yağ Ekstraksiyonu	33
2.3.3.	Sıvı Ekstraksiyonuyla Kolşisinlerin Ayrılması.....	34
2.3.3.1.	Kolşisin Ekstraksiyonu İçin Çözücü Hacmi Optimizasyonu.....	34
2.3.3.2.	Kolşisin Ekstraksiyonu İçin Çalkalama Süresi Optimizasyonu.....	35
2.3.4.	İnce Tabaka Kromatografisi.....	35
2.3.5.	Kolon Kromatografisi	35
2.3.6.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE).....	37
2.3.7.	Asit Hidrolizi.....	38
2.3.8.	HPLC Analizleri	38
3.	BULGULAR.....	40
3.1.	Yağ Ekstraksiyonu	40
3.1.1.	Yağ Bileşenlerinin GC-FID Analizi	41
3.2.	Çözücü Hacmi Optimizasyonu Çalışmaları.....	42
3.3.	Çalkalama Süresi Optimizasyonu Çalışmaları.....	43
3.4.	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	45

3.5.	Kolon Kromatografisi	46
3.6.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	56
3.7.	Asit Hidrolizi.....	59
3.8.	HPLC ile Kantitatif Analizler	60
3.8.1.	Çözücü Hacmi Optimizasyon Çalışmalarının HPLC Analizleri.....	63
3.8.2.	Çalkalama Süresi Optimizasyon Çalışmalarının HPLC Sonuçları	64
3.8.3.	SFE Çalışmalarının HPLC Analizleri	65
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	67
5.	KAYNAKLAR	69
	ÖZGEÇMİŞ.....	76

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

TÜRKİYE'DEN İHRAÇ EDİLEN *COLCHICUM* TOHUMLARININ İÇERİĞİNDEKİ
KOLŞİSİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Serhat BAYRAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Münevver Sökmen
2014, 75 Sayfa

Anadolu' da *Colchicum* cinsinin 27 türü (28 takson) sonbaharda, 8 tür ise erken ilkbaharda çiçek açmaktadır. Cins toplam 35 türden (36 takson) oluşur ve bunların 15 tanesi Türkiye için endemiktir. Bu bitkilerin tohumları toplanıp yurt dışına düşük fiyatlarda ihraç edilmektedir ve içeriğindeki kolşisin izole edilip çok yüksek fiyatlara ülkemize geri satılmaktadır. İhraç edilen tohumların %80' i *Colchicum speciosum* tohumlarıdır. Bu tohumların içersinde kolşisin, 3-demetil kolşisin ve kolşikosid bulunmaktadır. Kolşisin ağrı kesici, ateş düşürücü özelliğe sahiptir. Ayrıca gut hastalığının ve ailevi Akdeniz ateşi hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmanın amacı ülkemizde toplanan *Colchicum* tohumlarının içeriğindeki kolşisinin izole edilebileceği kolay bir ekstraksiyon ve kolon izolasyon yöntemi geliştirmektir. Bu amaçla belirli hacimlerde ve belirli sürelerde 95:5 metanol-su ekstraksiyonu yapıldı. Ek olarak süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) yöntemi kullanıldı. Daha sonra silika jel, poliamid ve selüloz kolon dolgu maddelerinin kullanıldığı kolon kromatografisi çalışmaları yapıldı. Ekstraktların saflığı hem İTK ile hem de HPLC ile kontrol edildi. Sonuç olarak 200 mL metanol-su çözücü sistemi ile 5 saatlik çalkalama sonucu en iyi ekstraksiyon verimi elde edildi. Tohumlarda %0,2-0,25 kolşisin olduğu belirlendi. SFE ile 35 C° sıcaklıkta, 247 bar basınçta, 1,5 mL/dk akış hızında ve çeşitli oranlardaki modifiyerli çalışmalar sonucunda %0,2 civarında kolşisin içeren ham karışım elde edildi. Kolon kromatografisinde en uygun sabit faz silika olarak belirlendi ve etil asetat-metanol-su hareketli fazının çeşitli oranları kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: *Colchicum speciosum*, Kolşisin, SFE, İTK, Kolon kromatografisi, HPLC

Master Thesis

SUMMARY

EXTRACTION AND PURIFICATION OF COLCHICINE IN *COLCHICUM* SEEDS
WHICH ARE EXPORTED FROM TURKEY

Serhat BAYRAK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Münevver SÖKMEN
2014, 75 Pages

In Anatolia, 27 species (28 taxons) of *Colchicum* flowering in autumn and 8 species are in early spring. Genus comprises of totally 35 species and 15 of them are endemic to Turkey. These seeds are collected and exported at low prices, and after isolation of the colchicine it has been sold back to our country at high prices. Aproximately, %80 of exported seeds is *Colchicum speciosum*. Colchicine, 3-demethyl colchicine and colchicoside are present in the seeds. Colchicine has analgesic and anti-inflammatory effects. It is also used for remediation of acute gout attack and familial Mediterranean fever. Aim of this study is to develop an easy method for extraction and column isolation of *Colchicum seeds* for colchicines which is collected in our region. For this purpose, 95:5 methanol-water extraction was carried out at certain volumes and extraction periods. Additionally, supercritical fluid extraction (SFE) was used. After then column chromatography was applied using silica gel, poliamide and cellulose as stationary phase. The purity of extracts were controlled with TLC and HPLC. At the end of experiments, the best extraction efficiency were obtained employing 200 mL of methanol-water solvent system and 5 hours shaking. It is determined that the seeds include %0,2-0,25 colchicine. After SFE process, the crude extract, which has %0,2 colchicine, obtained from the 35 °C, 247 bar, 1,5 mL/dk CO₂ flow rate conditions. Silica gel was the best stationary phase for column chromatography and different rate of ethyl acetate-methanol-water mobile phase was used for isolation.

Keywords: *Colchicum speciosum*, Colchicine, SFE, TLC, HPLC, Column chromatography

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Soksilet düzeneği	11
Şekil 2.	Su destilasyonunda kullanılan Clevenger düzeneği.....	13
Şekil 3.	CO ₂ için basınç-sıcaklık diyagramı.....	15
Şekil 4.	İki faz bölgesindeki CO ₂ 'in artan basınç ve sıcaklıkla süperkritik hale geçişi.....	16
Şekil 5.	<i>Colchicum speciosum</i> bitkisinin toprak altı organı.....	22
Şekil 6.	<i>Colchicum speciosum</i> bitkisinin çiçekli görünümü	23
Şekil 7.	<i>Colchicum speciosum</i> bitkisinde kapsül meyve.....	23
Şekil 8.	<i>Colchicum speciosum</i> bitkisinin yayılış alanından bir görünüm	24
Şekil 9.	Kolşisinin yapı formülü	25
Şekil 10.	Kolşisinin stereoizomerleri	27
Şekil 11.	(aS, 7S)-kolşisin (solda) ve (aR,7S)-kolşisin (sağda)	27
Şekil 12.	Yağ ekstraktının GC-FID kromatogramı	41
Şekil 13.	Yapılan hacim belirleme ekstraksiyonları sonucu elde edilen ortalama ham	42
Şekil 14.	Yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen ham karışım yüzdeleri.....	43
Şekil 15.	Yapılan süre belirleme ekstraksiyonları sonucu elde edilen ortalama ham	44
Şekil 16.	Yapılan süre belirleme ekstraksiyonları sonucu elde edilen ham karışım	44
Şekil 17.	Ham ekstraktın İTK görüntüsü	46
Şekil 18.	Kolondan saflaştırılan kolşisinin İTK görüntüsü	47
Şekil 19.	Kolondan elde edilen kolşisin fraksiyonunun HPLC kromatogramı	47
Şekil 20.	Saf kolşisinin HPLC kromatogramı.....	48
Şekil 21.	Saf kolşisinin DAD spektrumu	48
Şekil 22.	Tanımlanamayan ancak kolşisin fraksiyonu ile izole edilen bileşenin ve kolşisinin DAD kromatogramları.....	49
Şekil 23.	3-demetil kolşisinin İTK görüntüsü	50
Şekil 24.	3-demetil kolşisin HPLC kromatogramı	50
Şekil 25.	3-demetil kolşisinin DAD spektrumu	51
Şekil 26.	Kolondan elde edilen kolşikosidin İTK görüntüsü	51
Şekil 27.	Kolondan elde edilen kolşikosidin HPLC kromatogramı	52
Şekil 28.	Kolondan elde edilen kolşikosidin DAD spektrumu	52
Şekil 29.	Poliamid ile yapılan kolonun İTK görüntüsü.....	53
Şekil 30.	Kolondan ayrılan kolşisin (solda) ve 3-demetil kolşisinin (sağda) İTK görüntüsü .	54

Şekil 31. İzole edilen kolşisin (solda) ve 3-demetil kolşisinin (sağda) İTK görüntüleri	55
Şekil 32. Kolondan izole edilen kolşisin fraksiyonunun HPLC kromatogramı.....	55
Şekil 33. Kolondan izole edilen 3-demetil kolşisinin HPLC kromatogramı.....	56
Şekil 34. SFE ekstraktlarının İTK görüntüleri	58
Şekil 35. SFE' den alınan ekstraktın HPLC kromatogramı (0,06, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 mL/dk modifiyer).....	58
Şekil 36. SFE ekstraksiyonu sonunda kalan tohumun metanol ile çalkalanması sonucu elde edilen kromatogram.....	59
Şekil 38. Sıcakta yapılan asit hidrolizinin HPLC kromatogramı ve kolşikosid pik alanı.....	59
Şekil 39. Asit hidrolizi yapılmamış üç adet ham ekstraktın kolşikosid alanları	60
Şekil 37. Soğukta yapılan asit hidrolizinin HPLC kromatogramı ve kolşikosid pik alanı.....	60
Şekil 40. 0,0225 ppm derişim de gözlenen kolşisin piki.....	61
Şekil 41. 1000 ppm derişimde gözlenen kolşisin piki.....	61
Şekil 42. 0,0225 ppm ve 1000 ppm arasındaki derişimlerde elde edilen kolşisin pikleri.....	62
Şekil 43. Tablo 7' deki verilere göre hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 44. Çözücü hacmi optimizasyonu için yapılan ekstraksiyonların standart ile birlikte HPLC Kromatogramı (200 mL 95:5 MeOH-su karışımı 24 saat çalkalama süresi).....	64
Şekil 45. En uygun çalkalama süresi belirleme deneylerinin HPLC kromatogramı.....	65

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Süperkritik akışkan özellik gösteren maddeler	15
Tablo 2. Yoğunluk, viskozite ve difüzyon hızları değerlerinin değişimi	17
Tablo 3. Bilinen <i>Colchicum</i> taksonları	20
Tablo 4. Kullanılan kimyasallar, kullanım amaçları ve markaları	32
Tablo 5. Kullanılan cihazlar ve markaları	32
Tablo 6. HPLC gradiyent programı	39
Tablo 7. 400 mL petrol eteri ile yapılan yağ ekstraksiyonu sonucu elde edilen yağ miktarları, yüzdeleri ve ortalaması	40
Tablo 8. 150 mL petrol eteri ile yapılan yağ ekstraksiyonu sonucu elde edilen yağ miktarı, yağ yüzdesi ve ortalaması	40
Tablo 9. Yağ içeriğinde yüksek oranda bulunan yağ asitleri (metil esterleri), alıkonma zamanları ve yağ içindeki yüzdeleri	41
Tablo 10. Modifiyersiz ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt miktarları, yüzdeleri ve ortalaması	56
Tablo 11. Modifiyerli ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt miktarları ve yüzdeleri	57
Tablo 12. Hazırlanan standart derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen alanlar	62
Tablo 13. Çözücü hacmi optimizasyon çalışmalarının HPLC sonuçları	63
Tablo 14. En uygun çalkalama süresinin belirlenmesi deneylerinin HPLC sonuçları	64
Tablo 15. Modifiyersiz SFE ekstraksiyonunun HPLC sonuçları	65
Tablo 16. Modifiyerli SFE ekstraksiyonunun HPLC sonuçları	66

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

μm	: Mikrometre
a/a	: Ağırlık/Ağırlık
atm	: Atmosfer
ATPaz	: Adenozin Trifosfataz
cm	: Santimetre
cm^2	: Santimetrekare
cm^3	: Santimetreküp
CO_2	: Karbon Dioksit
DAD	: Diyot Dedektörü (Diode Array Detector)
dk	: Dakika
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü (Flame Ionization Detector)
g	: Gram
G	:G kuvveti
GC	: Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)
GHz	: Gigahertz
HCl	: Hidrojen Klorür
HCN	: Hidrojen Siyanür
HP-İTK	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (High Performance Thin Layer Chromatography)
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
K	: Kelvin
K^+	: Potasyum İyonu
kg	: Kilogram
kHz	: Kilo Hertz
L	: Litre
M.E.	: Metil Ester
M.Ö.	: Milattan Önce
M/Z	: Kütle/ Yük oranı
m^3	: Metreküp

mbar	: Milibar
mg	: Miligram
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
mL	: Mililitre
mmHg	: Milimetre cıva
MPa	: Megapaskal
MS	: Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)
Na ⁺	: Sodyum İyonu
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat Derece
P _k	: Kritik Basınç
ppm	: Milyonda bir kısım (Part per Million)
s	: Saniye
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Ekstraktion)
T _k	: Kritik Sıcaklık
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacim/Hacim

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya üzerindeki tüm tüketici canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için ihtiyaç duydukları karbohidrat, yağ ve proteinler gibi temel besinlerin büyük bir çoğunluğunu bitkilerden karşılarlar. Primer metabolitler olarak adlandırılan bu bileşikler, bitkilerde ve insanlarda enerjinin açığa çıkarılması, kullanımı, nakli ve dönüşümü, sindirim, kalıtsal materyalin aktarılması gibi yaşamsal süreçlerde işlev görürler (Harborne ve Williams, 1971).

Besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal faaliyetlerin yanı sıra bitkiler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin kozmetik ve zirai mücadele alanlarında kullanılan bazı doğal ürünler üretirler. Bu ürünlere “sekonder bitki metabolitleri” adı verilir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Biyoaktif bileşikler, bitkiler tarafından üretilen insan ve hayvanlar üzerinde farmakolojik ve toksik etkileri olan, bileşiklerdir. Besinler, yüksek dozlarda tüketildiğinde farmakolojik ya da toksik etkiler oluşturmalarına rağmen (örneğin vitamin ve mineraller), bitkilerdeki besinler genellikle “biyoaktif bitki bileşiği” terimine dahil edilmezler. Bitkilerdeki tipik biyoaktif bileşikler sekonder metabolitler olarak üretilirler. Bu nedenle bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin tanımı; insanlar ya da hayvanlar üzerinde farmakolojik ya da toksikolojik etkileri olan sekonder bitki metabolitleridir.

Sekonder metabolitler karbohidratlar, aminoasitler, proteinler ve lipidler gibi bitkinin büyümesine ve gelişmesine yardımcı olan birincil biyosentetik ve metabolik yollarının yanında bitkilerde üretilir. Bunlar, bitkinin günlük fonksiyonu için ihtiyaç duyulmayan, bitki hücrelerindeki biyokimyasal yan ürünlerin oluşturdukları yan ürünler olarak tanımlanırlar. Filogenetik olarak, sekonder biyoaktif bileşiklerin rastgele sentezlendikleri görülmüştür. Ancak bu bileşikler gereksiz değildir. Bunlardan birkaçının, canlı hücrelerde önemli fonksiyonları yerine getirdiği bulunmuştur. Örneğin; flavonoidler, fotosentez boyunca oluşan serbest radikallere karşı koruma sağlar. Terpenoidler, polinatörleri (arı gibi tozlaştırıcı böcekler) veya tohum taşıyıcılarını çekebilir ya da diğer bitkileri inhibe edebilir. Alkaloidler, genellikle otobur hayvanları ya da böcek saldırılarını (fitoaleksinler) savuşturur. Diğer sekonder metabolitler, hücrel sinyal olarak

ya da diğer fonksiyonlardan sorumludur. Biyoaktif bileşik üreten bitkiler istisna olmak yerine kanun gibi görünür. Bu yüzden, çoğu bitkiler hatta yaygın gıda ve yem bitkileri bu tür bileşikleri üretme yeteneğine sahiptirler. Bununla birlikte tipik zehirli ya da tıbbi bitkiler, gıda ya da yem bitkilerine göre daha yüksek derişimlerde potansiyel biyoaktif bileşik içerir.

Bitkilerdeki biyoaktif bileşikler çeşitli ölçütlere göre sınıflandırılırlar. Klinisyen, farmakolog ya da toksikologlara uygun olarak klinik fonksiyonlarına göre sınıflandırılabilir (farmakolojik ya da toksikolojik etkileri). Biyolojik etkileri açısından sınıflandırma daha da karmaşıktır. Çünkü klinik sonuçlar sadece kimyasal olarak yakın ilişkili bileşiklere bağlı değildir. Kimyasal olarak çok farklı olan bileşikler bile benzer klinik etkiler oluşturabilirler. Botanik sınıflandırma, biyoaktif bileşik üreten bitkilerin aile ve cinslerine bağlı olarak yapılabilir. Yakın ilişkili bitkiler çoğunlukla aynı ya da kimyasal olarak benzer biyoaktif bileşikler üretirler. Ancak, genetik olarak az benzeyen türlerin bile benzer sekonder bileşikler ürettiği çeşitli sınıflandırma örnekleri yapılabilir. Ancak bu maddeleri biyokimyasal yollarına ve kimyasal sınıflarına göre sınıflandırmak daha kullanışlıdır.

Arkeolojik çalışmalarda elde edilen kalıntı ve bulgular, bitkilerin antik çağlardan beri ilaç olarak kullanıldığını göstermektedir. 60.000 yıl önce, bugünkü Irak sınırları içerisinde yaşamış olan Neanderthallerin, günümüzde dünyanın birçok yerinde tedavi amaçlı kullanılan gülhatmi bitkisini kullandıklarına dair kanıtlar bulunmuştur (Cowan, 1999). Anadolu'da ise bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı yüzyıllar öncesine hatta Hitit uygarlığının da öncesine dayanır (Başer, 2000). Hakkâri'deki Şanidar mağarasında bulunan yontma taş devrine ait mezarlarda bulunan bitki türleri bunun kanıtlarından biridir. Tarih öncesi dönemlerin dışında Sümer, Asur ve Akad medeniyetlerinde de bitkiler tedavi edici amaçlar için kullanılmıştır. Adamotu, banotu, haşhaş, kekik, nane, nar kabuğu ve safran gibi 250 kadar bitkinin bu dönemde kullanıldığı bilinmektedir (Baytop, 1999).

Batı medeniyetinin gelişiminin Fırat ve Dicle nehirleri etrafındaki alanda ortaya çıktığı belirtilmektedir. Bu bölgede bulunan, yaklaşık M.Ö. 4000 yılına ait kil tabaklar üzerindeki çizim ve yazılar, bu gün afyon, kekik ve meyan kökü olarak bilinen bitkilerin tıbbi bitki olarak kullanımının o zamanın kültürlerinde de bilindiğini göstermiştir. Babil'de büyük olasılıkla tıbbi ilaç olarak kullanılan birçok bitkinin kayalardaki işlemleri bulunmuştur. Belgeler sinameki, kişniş, safran, tarçın, sarımsak kullanımının yanı sıra bazı

karışımların dışarıdan kullanım için merhem olarak ve içeriden kullanım için iksir olarak kullanıldığını göstermektedir.

Mısır kültürü, mısırlıların bitkileri tıbbi amaçlı kullanımları ile ilgili geniş bilgilerinden bizlere çok sayıda belge vermiştir. Bunlar, en azından M.Ö. 3000' e dayanır ve en iyi bilineni, adını eski bir Mısır uzmanı olan Alman Mısır bilimcisi George Ebers' den alan Ebers Papirüs' leridir. Belgeler en az 800 tarif ve Babilliler tarafından bilinen 700 yerli ve yabancı kökenli bitkiyi içermektedir. Bunlarına arasında aloe, pelin otu, nane ve Hint kenevirinin yanı sıra sarımsak, haşhaş, ardiç, kimyon, risin tohumları ve arap zamkından bahsedilmiştir. Burası, tıbbi bitkilerin kullanımını bilgisinin bulunduğu Dünya' daki tek bölge değildir. M.Ö. 3000 yıllarında yaşamış Çin imparatoru Shen Nung haşhaş, meyan kökü, çavdar mahmuzu, ravent, yılan otu ve kedi otu gibi bitkilerin tanımlarını içeren Pen tsáo isimli bir belge bırakmıştır. Bu durum göstermektedir ki, birbirinden çok farklı kültürler, aynı zaman diliminde bu bitkilerden bazılarını kullanmışlardır ve bazıları hala günümüzde de kullanılmaktadır. Ayrıca Ayurveda' nın Hindistan sisteminde, tıbbi bitkilerin kullanımından sık sık bahsedilmektedir ve en başından beri kullanılan bu bitkiler hala günümüzde de kullanılmaktadır (Paulsen, 2010).

Tarih boyunca bitkilerin, Anadolu'da yaygın bir şekilde kullanılmasının sebebi bu bölgenin fitocoğrafik özelliğinin bir sonucudur. Çeşitli iklim tiplerinin etkisinde olması ve sahip olduğu coğrafi konum, Anadolu'daki flora çeşitliliğinin oluşmasına sebep olmuştur (Başer, 2000). Anadolu'da 11.000'in üzerinde bitki türü bulunur ve bunların yaklaşık 3000 tanesi endemiktir (Coşkun ve Özkan, 2005).

1.2. Bitkisel Kökenli Biyoaktif Bileşikler

1.2.1. Glikozitler

Glikozitler mono ya da oligosakkaritlere ya da üronik asite bağlı çeşitli kategorilerde ikincil metabolitler içerir. Sakkarit ya da üronik asit kısmına glikon, diğer kısmına aglikon denir. Glikozitlerin ana grupları kardiyak glikozitler, siyanojenik glikozitler, glukosinolatlar, saponinler ve antrakınon glikozitlerdir. Ayrıca, flavonoidler sıklıkla glikozit olarak oluşur. Glikozitler vücuda alındıktan sonra genellikle kalın bağırsağın kolon kısmında hidroliz olur ve daha hidrofobik olan aglikon absorplanabilir.

1.2.1.1. Kardiyak Glikozitler

Kardiyak glikozitlerin aglikonları bir steroid yapısına sahiptir. Hücre membranlarındaki etkisi Na^+/K^+ -ATPaz- pompasının inhibisyonudur. Bu pompalar kalp hücrelerinde yoğunlaşmıştır ve bu hücrelerin fonksiyonları için önemlidir. Kalp ile ilgili glikozitler tipik olarak *Scrophulariaceae* familyasında, *Digitalis purpurea* ve *Convallaria majales* ile *Convallariaceae* familyasının bitkilerinde görülür.

1.2.1.2. Siyanojenik Glikozitler

Siyanojenik glikozitler, aminoasitlerden türetilen aglikonlara sahiptir. Bu bileşiklerden bazıları iyot kullanımında ve hipotiroidizm sonucunda girişim yapabilirler. Diğer önemli etkisi, yüksek dozlarda çok zehirli, öldürücü bir kimyasal olan hidrojen siyanür (HCN) salınımı ile olur. Siyanojenik glikozitler *Rosaceae* familyasının *Prunus* türlerinde görülür.

1.2.1.3. Glikosinolatlar

Glikosinolatlar, kükürt içeren keskin kokulu aminoasit türevi aglikonları içerir. Bu bileşikler çeşitli hücrelerdeki sitokrom P450 izoformlarının üzerinde karmaşık etkiler gösterir ve çevresel kanser yapıcı maddelerin karaciğerdeki biyoaktivasyonunu azaltma eğilimi gösterir. Glikosinolatlar cildi tahriş edebilir ve ayrıca hipotiroidi ve guatrı indükler. *Brassicaceae* başlıca glukosinolat üreten bitki familyasıdır.

1.2.1.4. Saponinler

Çoğu saponinler (sabun köpüğü oluşturan bileşikler) glikozit olarak oluşur. Aglikonlar, ya pentasiklik triterpenoidleri ya da tetrasiklik steroidleri içerir. Yapı olarak farklıdır ancak belli başlı ortak fonksiyonel özelliklere sahiptirler. Saponin glikozitleri, emülsiyon haline dönüşme özelliği gösteren ve deterjan olarak kullanılabilen, hidrofilik bir glikon ve hidrofobik bir aglikona sahip büyük moleküllerdir. Saponinler bağışıklığı zayıflatıcı ve antineoplastik etkiler gösterir. İn vitro ortamdaki yaygın etkisi, kırmızı kan

hücrelerini hemoliz etmesidir. Bununla birlikte bu etki in vivo ortamda bir problem olarak görülmez. Bazı saponinler foto uyarılmayı ve sarılığı indükler. Saponinler, çok çeşitli bitki familyasında gözlemlenir. Bunların arasında *Liliaceae* familyası ile koyun zehirleyici bir bitki olan *Narthesium ossifragum* bitki türü örnek olarak gösterilebilir.

1.2.1.5. Antrakınon Glikozitleri

Antrakınon glikozitleri, bitki krallığında nispeten sınırlı dağılım gösterir. *Polygonaceae* familyasında, *Rumex crispus* ve *Rheum* türlerinde görülür. Başlıca etkisi, suyun indüklenmesi ve besinlerin bağırsaktan geri emilimi sırasında elektrolit salgılanmasını sağlamasıdır.

1.2.2. Flavonoidler ve Proantosiyanidinler

Flavonoidler, merkezi üç halkalı yapılara sahiptirler. Proantosiyanidler, flavonoidlerin oligomerleridir. Her iki bileşik grubu glikozit olarak oluşabilir. Fenol grubu içeren tüm bileşikler genel antioksidan özellik gösterirler. Bazı flavonoid yapıları ateşi ya da karsinojenliği azaltma gibi etkilere sahiptirler. İzoflavonlar grupları başlıca fitoöstrojenler olarak bilinirler. Flavonoidler ve proantosiyanidler çok geniş bir bitki familyası tarafından üretilirler. İzoflavonlar *Fabaceae* familyası tarafından üretilir.

1.2.3. Tanenler

Flavonoidlerin büyük polimerlerinden oluşan yoğun tanenler ve birkaç kateşin türeviden eklenmiş, monosakkarit çekirdeğinin (çoğunlukla glukoz) polimerlerinden oluşan ve hidroliz edilebilen tanenler olmak üzere iki farklı türü vardır. Bu iki tip tanenin bir çok ortak özelliği vardır. Ancak hidroliz edilebilen tanenler daha az kararlı ve toksisiteye sebep olma potansiyeli daha büyüktür. Tanen molekülünün boyutundan dolayı sudaki çözünürlüğü azalmıştır ve sınırlanmıştır. Tanenler, proteinlere gelişigüzel şekilde bağlanır ve oluşan daha büyük yapıları ishal, vücut kanamaları ve transüda durumlarında durdurucu olarak kullanılırlar. Tanenler, bitki krallığında çok geniş bir alana dağılmışlardır.

Tanen içeren bitki familyalarına *Fagaceae* ve *Polygonaceae* familyaları örnek olarak verilebilir.

1.2.4. Mono ve Seski (bir buçuk)-Terpenoidler ve Fenilpropanoidler

Terpenoidler, beş karbonlu yapı bloğu izopren yolu ile sentezlenir. Monoterpenoidler iki izopren birimi, seskiterpenoidler ise üç izopren biriminden oluşur. Bunlar, düşük molekül ağırlıklı terpenoidler olarak tanımlanır ve 25000' in üzerinde tanımlanmış bileşik ile bitki bileşenleri kategorisinde en çok çeşide sahip olan maddeleri temsil eder. Daha az çeşidi olan fenil propanoidler dokuz karbonlu iskeletten oluşur ve farklı bir yol ile sentezlenirler. Tüm bu üç grubun bileşikleri lipofiliktir ve ayrıca kolayca buharlaşabilme eğilimindedirler. Güçlü tatları ve kokuları vardır. Bitkisel ilaç olarak kullanım alanlarına göre çok çeşitli etkiler gösterir. Mide-bağırsak uyarımının yanı sıra antineoplastik, antibakteriyel, antiviral özelliklere sahiptir. Uçucu yağ olarak yoğun hale getirilmedikleri sürece toksik olarak ilişkilendirilemezler. Bu bileşikler için en çok bilinen bitki familyası *Lamiaceae*' dir. Ancak çeşitli diğer bitki familyalarında da mevcuttur (Bernhoft, 2010)

1.2.5. Diterpenoidler

Diterpenoidler dört izopren biriminden oluşurlar (20 karbonlu). Diterpenoidler çok lipofiliktir ve güçlü tatlara sahiptirler. Ancak uçucu olmadıklarından dolayı kokusuzdurlar. Küçük moleküllü terpenoidlere göre daha az toksikolojik bilgi mevcuttur. Bu bileşiklerden bazıları antineoplastik aktiviteye sahiptir. Diterpenoidler *Coffea arabica*' nın da aralarında bulunduğu birkaç bitkide görülmektedir. Diterpenoidler ayrıca reçinelerde mevcuttur.

1.2.6. Reçineler

Reçineler karmaşık, yağda çözünen karışımlardır. Genellikle hem uçucu olan hem de uçucu olmayan bileşiklerin karışımıdır. Uçucu olmayan kısım diterpenoid ve triterpenoidleri içerebilir. Mono- ve seskiterpenoidler çoğunlukla uçucu kısımda bulunur. En tipik olanı, ağaçlar yapılar tarafından salgılanan reçinelerdir. Reçineler ayrıca otsu bitkilerde de bulunabilir. Uçucu bileşiklerin içeriğine göre tamamen yapışkan ya da

akışkandırılar. Havaya maruz bırakıldığında sertleşir. Çoğu reçineler antimikrobiyaldir ve yara iyileştiricidir. Ancak etkileri kimyasal karışımına bağlı olarak değişir. Reçineler genellikle güvenlidir ancak temas edildiğinde alerjiye sebep olabilir.

1.2.7. Lignanlar

Lignanlar, çeşitli fonksiyonel grupların bağlandığı, 18-karbonlu bir iskelet oluşturmak için iki fenilpropanoid biriminden oluşmuştur. Genellikle lipofildir ve bitki hücre membranlarında yapısal fonksiyonlara sahiptir. Lignanlar, yağlı tohumların içerisinde yüksek derişimlerde bulunurlar. Ancak farklı familyaların değişik türlerinin diğer kısımlarında bulunabilirler. Bazı lignanlar fitoöstrojenik, müshil ve antineoplastik etki olmak üzere çeşitli klinik aktiviteler göstermektedir.

1.2.8. Alkaloidler

Alkaloidler tatları acı, genellikle yüksek aktiviteye sahip nitrojen içeren heterosiklik bileşiklerdir. Bitki krallığında sınırlı dağılıma sahiptir. Çeşitli grupları çeşitli klinik özelliklere sahiptirler.

1.2.8.1. Tropan Alkaloidleri

Tropan alkaloidleri; *Solanaceae* familyasında görülür ve *Atropa belladonna*, *Datura* ve *Hyoscyamus niger* türleri örnek olarak verilebilir. Bu bileşikler antikolinergik aktiviteye (muskarin reseptör düşmanı) sahiptir ve tıbbi olarak düz kas spazmlarını, hipersekresyonu (salgı bezlerinden aşırı salgı salgılanmasını) ve ağrıyı azaltır.

1.2.8.2. Pirrolizidin Alkaloidleri

Asteraceae familyası tarafından üretilir. Özellikle *Senecio* ve *Boraginaceae* familyası türlerinde rastlanır. Bu maddelerin biyoaktivasyonundan sonra insanlardaki ve hayvanlardaki yan etkisi hepatotoksistedir (karaciğerde transaminaz enzimlerinin-sitoplazma ve mitokondride bir amin grubunun aminoasitten ketoasite taşınmasını ya da bunun tersini sağlayıcı enzim- aşırı artması).

1.2.8.3. İzokinolin Alkaloitleri

Papaveraceae ve *Berberidaceae* familyaları izokinolin alkaloitlerini üretirler. Bu alkaloitler klinik olarak geniş bir biyokimyasal etkiye sahiptir. Ağrı, kanser hücreleri ve bakteriler, ve kemik iliği lökositlerinin uyarılması gibi çeşitli durumların inhibitörü olarak kullanılırlar.

1.2.8.4. Metilksantin alkaloitleri

Başlıca metil ksantin üreten türler *Coffea arabica* ve *Theobroma cacao*' dur. Metilksantinlerin çeşitli kısımlarlı adenosin reseptörlerine bağlanır ve insanlarda ve hayvanlarda nörolojik etkiler meydana getirir. Kemirgenlerde, vücuda yüksek oranlarda metilksantin alımı, sperm üretiminde azalmaya ve testiküler atrofiye sebep olur.

1.2.8.5. Pseudoalkaloitleri

Pseudo alkaloitleri olarak adlandırılan bu bileşikler alkaloitlere yakın kimyasal özellikler gösterirler. *Apiaceae* ve *Taxaceae* familyaları tarafından üretilirler. *Cicuta virosa* ve *Conium maculatum* türleri *Apiaceae*' ye, *Taxus baccata* türü ise *Taxaceae*' ye örnek olarak verilebilir. *Cicuta virosa* ve *Conium maculatum*' daki pseudoalkaloitlerinin merkezi sinir sistemi üzerinde, *Taxus baccata*' daki taksin ise kalpteki iyon transferinin inhibisyonu üzerinde etkisi vardır.

1.2.9. Furokumarinler ve Nafta diantronlar

Apiaceae familyasının *Heracleum* türlerindeki furokumarinler fotosensitizan (ışığa karşı duyarlılık sağlayan ilaç) özelliklere sahiptirler. *Clusiaceae* familyasının *Hypericum* türünde ve *Poligonaceae*' nin *Fagopyrum esculentum* türlerindeki nafta diantronlar da benzer etkilere sahiptirler. *Hypericum* türündeki bileşikler antidepresan etkiye sahiptirler.

1.2.10. Proteinler ve Peptitler

Bitkilerdeki proteinler, gıdalarda ve yemlerde önemli bir kaynaktır. Aminoasitler insanların ve hayvanların bağırsaklarında absorplanır ve proteinler sentezlenir. Bununla birlikte, biyoaktiviteye sahip bitki proteinleri ve peptitleri de mevcuttur. Bunlar, genellikle sindirim sisteminde hidroliz edilemezler. Ancak bazı kısımları absorplanabilir ve vücutta özel bir etki oluşturabilir. *Euphorbiaceae* familyası bu tür proteinleri içerirler. *Ricinus communis*' in tohumlarındaki risin bu proteinlere örnek olarak verilebilir. Çok güçlü küçük bir protein (lektin) olan risin, protein sentezini inhibe eder ve mide-bağırsak semptomları oluşturarak insan ve hayvanlarda sistemik etkiyi indükler. Daha az güçlü lektinler de *Fabaceae* familyasının bazı tohumlarında gözlemlenirler. Eğer tohumlar, lektinleri etkisiz hale getiren yeterli bir ısı tedavisi yapılmaksızın yenilirse, kolik ve diğer mide-bağırsak semptomları oluşabilir (Bernhoft, 2010).

1.3. Biyoaktif Bileşenlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler

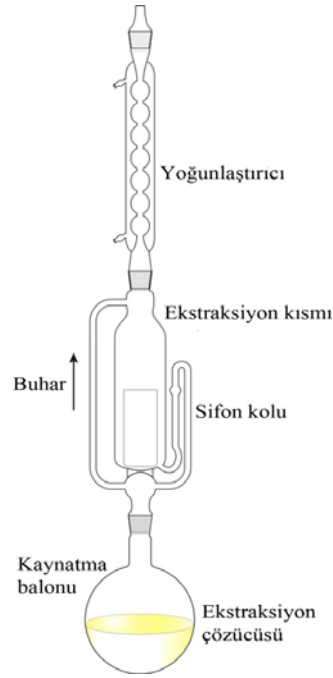
Bitkiler belirli oranlarda yapılarında biyoaktif bileşikler bulundurlar. Bitki ekstraktları gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bu sebeple elde edilen doğal bileşiklerin ticarileştirilmesi amacıyla çeşitli ekstraksiyon metotları araştırılmaktadır. İdeal bir ekstraksiyon süreci hızlı, basit ve ucuz olmalıdır. Ekstrakte edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramamalı, ek bir saflaştırma işlemi gerektirmemeli ve atık çözücü içermemelidir. Genelde çözücü ekstraksiyonu (katı-sıvı ekstraksiyon-maserasyon) bu koşulları sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu basit ve ucuz bir yöntemdir fakat birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bunların en başında yüksek ısı ve çözücü tüketimi gelmektedir. Genellikle çevre, sağlık ve güvenlik açısından zararlı çözücüler kullanılır. Kullanılan ısı ve çözücüler ürün kalitesini etkiler, dolayısıyla ısıl bozunmaya uğrayan hassas maddelerin ekstraksiyonu için geleneksel çözücü ekstraksiyonu uygun bir yöntem değildir. Ayrıca ekstraksiyon işleminden elde edilen ekstraktlar seyreltiktir. Hedef ürünün çözücülerden ayrılıp deriştirilmesi için ek bir ayırma işlemine gerek duyulur. İşlem süresi uzun ve işletme maliyeti yüksektir. Tüm bu sebeplerden dolayı alternatif ekstraksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur (Wang ve Weller, 2006; Kılıç, 2008). Katı-sıvı ekstraksiyonuna alternatif olarak geliştirilen diğer ekstraksiyon yöntemleri:

- Soksilet ekstraksiyonu
- Ultrasonik ekstraksiyon
- Mikrodalga ekstraksiyon
- Uçucu Bileşenlerin ekstraksiyonu (Clevenger yöntemi)
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu

olarak belirtilebilir. Bu teknikler ile yüksek sıcaklık ve basınçta çalışmak mümkün olmakta ve ekstraksiyon zamanı dikkat çekici bir şekilde azaltılmaktadır.

1.3.1. Soksilet Ekstraksiyonu

Soksilet ekstraktörü; 1879 yılında Franz von Soksilet tarafından katı bir deney numunesinden yağ ekstrakte edilmesi amacıyla icat edilen bir laboratuvar cihazıdır. Yağ ekstrakte etmek için tasarlanmış olmasına rağmen bir bileşiği bir katıdan ekstrakte etmek amacıyla her deneyde kullanılabilir. Genellikle, kuru numune Soksilet ekstraktörüne yerleştirilen, filtre kağıdından yapılmış yüksük şeklinde bir ekstraksiyon tüpüne yerleştirilir (Şekil 1). Ekstraktöre, çözücü içeren şilifli bir cam balon ve yoğunlaştırıcı takılır. Çözücü ısıtılır ve buharlaştırılır. Sıcak çözücü buharı yoğunlaştırıcıya ilerler, yoğunlaşarak katı numunenin üzerine düşer. Numuneyi içeren ekstraksiyon tüpünün bulunduğu yüksük yoğunlaşan çözücü ile tam dolduğunda, bypass kolunun seviyesine ulaşır ve sifon oluşarak çözücü tekrar cam balona boşalır. Bu yoğunlaşma, yükselme ve sifon döngüsü, 'reflux' olarak adlandırılır ve sürekli tekrar edilir. Her döngü sırasında, katının içerdiği bir miktar yağ çözücüde çözünür. Ama çözücünün ısıtılan cam balonuna ulaştığında orada kalır, döngüye tekrar katılmaz. Bu durum, bu ekstraksiyon metodunun en önemli avantajıdır. Sadece saf çözücü, katıyı ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşır, döngüye katılır. Bu nedenle, bir cam balonda katıyı çözücü içerisinde ısıtarak ekstrakte etme yöntemiyle karşılaştırıldığında Soksilet ekstraktörü ile uygulanan bu yöntemin verimi daha yüksektir. Ekstraksiyonun sonunda arta kalan çözücü, rotary buharlaştırıcısı ile uzaklaştırılarak ekstrakte edilmiş olur (URL-1, 2014)



Şekil 1. Soksilet düzeneği

1.3.2. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu

Ses dalgaları, farklı ortamlar içinde yayılan ve frekansları 20 kHz üstünde olan boyuna dalgalardır. Bu dalgalar buldukları ortama göre (katı, sıvı ve gaz) farklı titreşimde ve hızda yayılırlar. Ses dalgası bir ortamda yayılırken; ortamın parçacıkları, dalga hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişiklikleri oluşturarak titreşirler. Bu parçacık hareketi, dalga hareketinin yönüne dik olan enine dalga hareketindeki durumun tersidir. Ses dalgaları şeklinde ortaya çıkan yer değiştirmeler, denge konumundan itibaren her bir molekülün boyuna yer değiştirmesini gerektirir. Bu sıkışma ve genişleme, yüksek ve alçak basınç düşmelerine yol açar. Bir mikrofonun diyaframındaki gibi, ses dalgası kaynağı sinüsel olarak titreşirse, basınç değişimleri de sinüsel olur (Halliday ve Resnic, 1992; Erte, 2007).

Ultrasonik indüklemenin mekanik etkisi kütle transferinin artırılarak çözücülerin hücrelere etki etmesi olarak tanımlanabilir. Ekstraksiyon esnasında ultrasonik (ses dalgaları) hücre duvarına etki etmekte ve bileşenlerin bırakılmasını sağlamaktadır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan çalışmalarda ultrasoniğin mekaniksel etkisi sonucu hücre duvarının yıkıldığı ve bundan kaynaklı olarak bileşenlerin serbest kaldığı kanıtlanmıştır. Bitkiye özgü nem oranı, tanecik büyüklüğü ve kullanılan çözücü

gibi faktörler yanında, frekans, sıcaklık ve zaman gibi faktörler de ultrasonik ekstraksiyon verimine etki etmektedir. Pahalı olmaması, basit olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olması ve ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması bu metodun avantajları olarak belirtilebilir (Wang ve Weller, 2006).

1.3.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

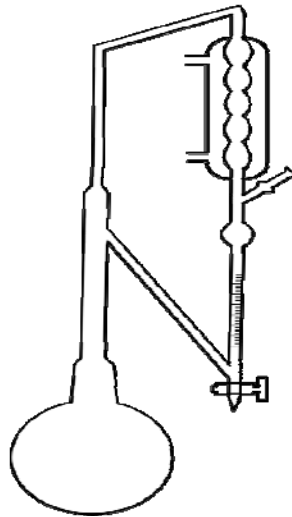
İkinci dünya savaşından beri kullanılan mikrodalga teknolojisinin, analitik laboratuvarında kullanımı 1970'lerin sonunda olmuştur. Mikrodalgalar 0,3-300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır ve genellikle doğal ürünlerde 2,5-75 GHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olarak değişmektedir. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu enerji daha hızlı yayılmaktadır (Kılıç, 2008) Mikrodalga ısıtmasının avantajı moleküllerin kutuplarındaki yükseltgenen zayıf hidrojen bağlarını bozundurmasıdır. Klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin aksine, mikrodalgalar ile örneğin tamamı aynı anda ısıtılmaktadır. Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmektedir. En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrolü yapılabilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir (Beejmohun vd., 2007; Kılıç, 2008)

Klasik çözücü ekstraksiyonunda ürün miktarını arttırmak için katı matriksler tamamen çözücü içerisine yerleştirilirken, mikrodalga ekstraksiyonda çözücü miktarının artırılması ekstraksiyon verimini, mikrodalga ile çözücünün yeterince etkileşememesine bağlı olarak azaltılmaktadır. Sıcaklığın artırılması ile ekstraksiyon veriminin arttığı fakat ısıya duyarlı bileşiklerin bozunmasına sebep olduğu belirtilmektedir. Ekstraksiyon zamanının ve kullanılan çözücü miktarının azaltılması, ekstraksiyon veriminin iyileştirilebilmesi, basit ve ucuz bir işlem olması bu metodun avantajlarıdır. Bununla birlikte katı atıkların giderilmesi için filtreleme ve santifürj gerekmesi, apolar ve uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olmaması dezavantaj olarak belirtilebilir (Wang ve Weller, 2006).

1.3.4. Uçucu Bileşenlerin Su Buharı Ekstraksiyonu (Clevenger Yöntemi)

Uçucu bileşikleri elde etmek için yaygın olarak kullanılan geleneksel bir ekstraksiyon yöntemidir. Su destilasyonu, kaynatıldığında bozulmayan taze ve kuru bitkisel materyale uygulanabilir. Ester içeren uçucu yağlar için kullanılamaz. Yöntemin esası, soğutucuya bağlanmış bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2–8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılmasına dayanmaktadır. Su destilasyonunda bitkisel materyal her zaman su ile doğrudan temas halindedir (Tanker ve Tanker, 1985; Wijesekera, 1993). Küçük ölçekli üretimlerde Şekil 2’ de görülen Clevenger tipi bir aparatla yapılan destilasyon işlemi, endüstriyel uygulamalarda büyük destilasyon kazanlarında gerçekleştirilmektedir. Elde edilen uçucu yağ miktarı volumetrik olarak ifade edilir. Su destilasyonu en iyi toz halindeki materyallerde (örneğin; kök ya da odun unu) sonuç vermektedir (Linskens ve Jackson, 1997).

Elde edilen yağ miktarı çok olmakla birlikte suyun kaynatılması esnasında uygulanan yüksek sıcaklık, termal bazı reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bunun sonucu olarak hidroliz ve izomerizasyon olayları meydana gelmektedir. Uçucu yağların bileşimi pH’ a bağlı olarak değişse de su destilasyonu yönteminde genellikle sıvının pH değeri kontrol edilememektedir (Fakhari vd., 2005).



Şekil 2. Su destilasyonunda kullanılan Clevenger düzeneği

1.3.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Baron Charles Cagniard de la Tour 170 yıl önce kritik sıcaklığın üzerinde bir maddenin akışkan olarak bulunduğunu deneylerle göstermiştir (Clifford, 1999). Son 20 yılda süperkritik akışkan teknolojisinin uygulamaları ekstraksiyon ve kromatografi alanlarında olmuştur (Sun, 2002). Ayrıca birçok bilimsel araştırmada doğal kaynaklardan bileşiklerin izolasyonunda süperkritik koşullardan yararlanılmıştır. Geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha fazla avantajı olan süperkritik akışkan ekstraksiyonu ayarlanabilen akış gücü ile doğru orantılı olarak daha kolay bir yöntemdir. Ekstreden çözücünün uzaklaştırılması işleminin uzun, yorucu olması ve organik çözücü kalıntıları gibi problemlerin varlığı ortadan kalkmış olmaktadır. (Reverchon, 2006).

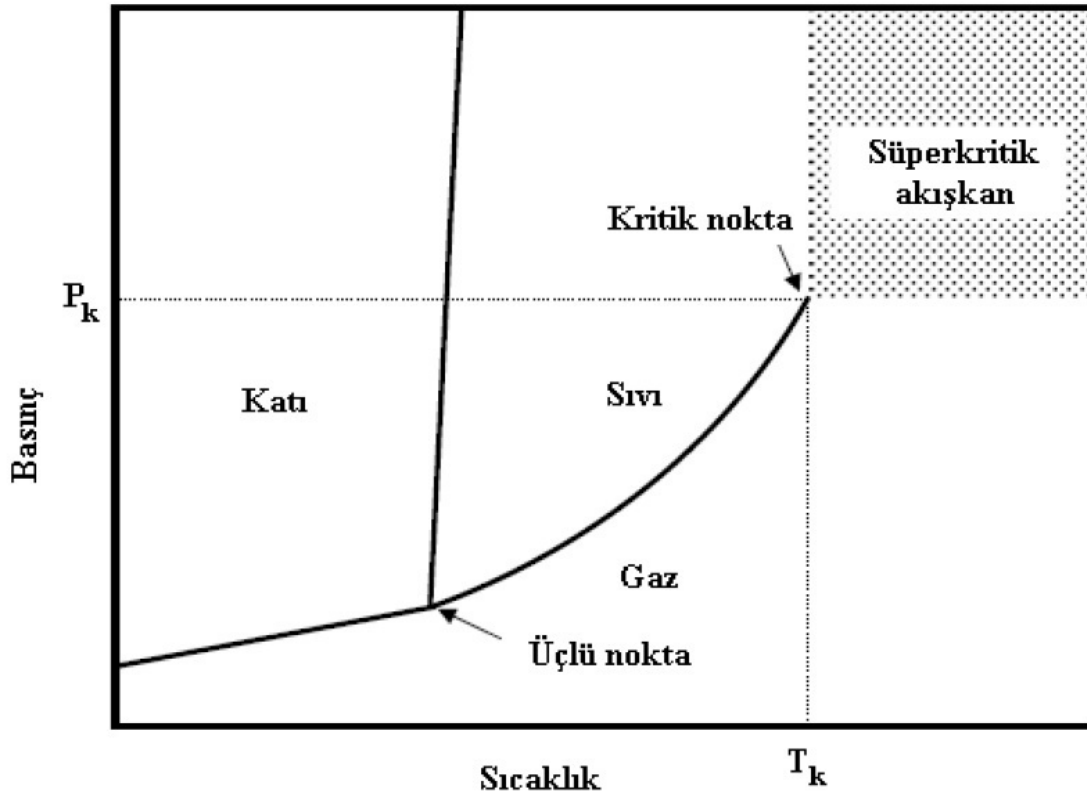
1.3.5.1. Süperkritik Akışkanların Tanımı

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisi üzerinde ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki fark kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılır. Kritik sıcaklık artan basınçla gazın sıvıya dönüştüğü en yüksek sıcaklık, kritik basınç ise sıvının sıcaklığının artırılmasıyla sıvının gaza dönüştüğü en yüksek basınçtır. Maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_k), basıncı ise kritik basıncının (P_k) üzerine çıkıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan” olarak tanımlanır. Süperkritik akışkanların kullanılmasıyla değerli bileşenlerin ekstraksiyonu veya maddelerin uzaklaştırılmasına süperkritik akışkan ekstraksiyonu denir (Taylor, 1996; Arai, 2002; Çalıklı, 2003). Süperkritik akışkan farklı gaz türlerinden elde edilebilir. Bu gazlar ve süper kritik akışkan özellikleri aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Süperkritik akışkan özellik gösteren maddeler

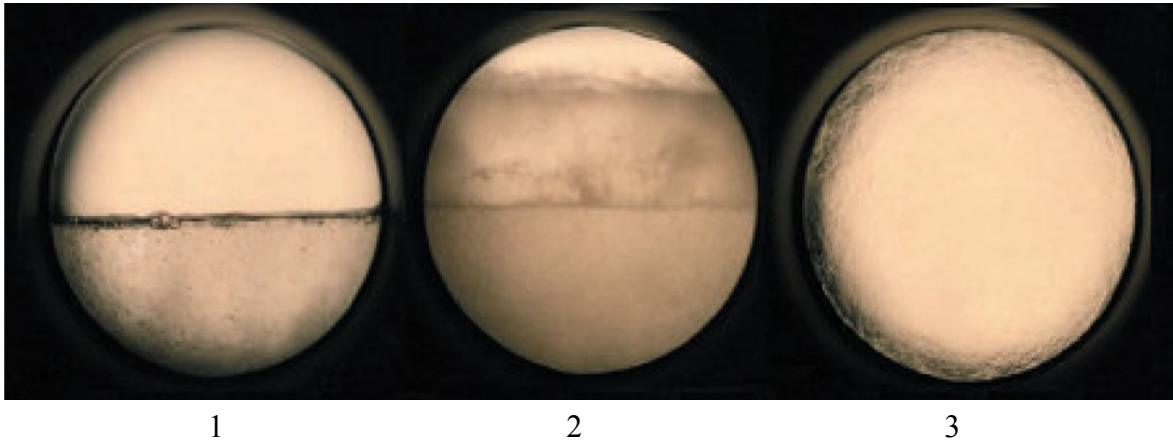
Çözücü	T_k (K)	P_k (MPa)	ρ_k (kg/m ³)
Etilen	282,5	5,0	220
Karbondiyoksit	304,1	7,4	470
Etan	305,4	4,9	200
Propan	369,9	4,3	220
Amonyak	405,4	11,3	240
n-pentan	469,6	3,4	240
Metanol	512,7	8,1	270
Toluen	591,8	4,1	290
Su	647,7	22,1	320

CO₂ için faz diyagramı Şekil 3’de verilmektedir. Sıvı ve gazın bir arada bulunduğu eğri kaynama eğrisi olarak bilinir. Kaynama eğrisi üzerinde yukarı yönde hareket edildiğinde sıcaklık ve basınç artar. Termal genişlemeye bağlı olarak sıvının yoğunluğu azalırken basınçtaki artışla gazın yoğunluğu artar. Sonunda iki fazın yoğunlukları ortak bir noktaya yaklaşır ve özdeş hale gelir (Oakes vd., 2001).

Şekil 3. CO₂ için basınç-sıcaklık diyagramı

Akışkanın yoğunluk, difüzyon, dielektrik sabiti ve viskozite gibi fizikokimyasal özellikleri faz sınırlarını geçmeden sıcaklık ve basınçtaki değişimlerle rahatlıkla kontrol edilebilir (Sihvonen, 1999; Noon, 2007). Kritik nokta yakınlarında sıcaklık veya basınçtaki küçük değişiklikler yoğunluğu, buna bağlı olarak da akışkanın çözme gücünün büyük oranda değiştirilebilmesi ile daha etkin çözünürlük sağlamaktadır. Böylece süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri maddenin moleküler yapısı değişmeden önemli şekilde değiştirilebilir (Ghaderi, 2000). Süperkritik akışkan gaz fazın üstün kütle transfer özelliklerine, sıvı fazın ise karşılaştırılabilir çözücü gücüne sahiptir (Noon, 2007).

Sıvı ve gaz fazları arasındaki ayrımın kritik noktaya ulaşıldığında ortadan kalkması Şekil 4' de verilmiştir. Şekil 4.1' de sıvı-gaz sisteminde ayrım açıkça ayırt edilebilirken sistemin sıcaklık ve basıncının arttırılmasıyla Şekil 4.2' de olduğu gibi ayrım daha az fark edilir. Bu durum iki fazın yoğunlukları arasındaki farkın azalmasından kaynaklanır. En sonunda Şekil 4.3' de olduğu gibi ayrım tamamen ortadan kalkar ve sistem homojen hal alır (Oakes vd., 2001).



Şekil 4. İki faz bölgesindeki CO₂'in artan basınç ve sıcaklıkla süperkritik hale geçişi

Tablo 2' de gaz ve sıvı fazlar için 288-303 K sıcaklık ve 1 atm basınç, süperkritik akışkan fazı için ise 304,1 K sıcaklık ve 7,4 MPa (~73 atm) basınç koşullarında çeşitli fizikokimyasal özellikleri verilmiştir (Brunner, 2005).

Tablo 2. Yoğunluk, viskozite ve difüzyon hızı değerlerinin değişimi

Özellik	Sıvı	Süperkritik Akışkan	Gaz
Yoğunluk (g/cm ³)	0,6-1,6	0,2-0,5	(0,6-2,0)x10 ⁻³
Viskozite (g/cms)	(0,2-3,0)x10 ⁻²	(1,0-3,0)x10 ⁻⁴	(0,6-2,0)x10 ⁻⁴
Difüzyon hızı (cm ² /s)	(0,2-2,0)x10 ⁻⁵	0,7x10 ⁻³	0,1-0,4

Süperkritik akışkanın yoğunluğu sıvının, viskozitesi ve difüzyon hızı ise gazların özelliğine yakındır (Mukhopadhyay, 2000).

Yoğunluğun artması ile süperkritik akışkanların çözme gücü artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedir. Süperkritik akışkanların difüzyonunun artması ve viskozitenin azalması gibi özellikleri sayesinde katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca difüze olmakta ve çözme güçleri artmaktadır (Şanal, 2004).

Ayrıca akışkanın sahip olduğu düşük viskozite pompalama sırasında daha az enerji gerektirmektedir. Süperkritik akışkanların gaz benzeri özellikleri sayesinde kısa süre içinde gerçekleşen ekstraksiyonda çözünen geri kazanımının fazla olması ideal ortamı sağlar.

Süperkritik akışkanların gaz benzeri diğer bir özelliği de yüzey geriliminin olmamasıdır. Sistem hacmini hızlı bir şekilde doldururlar. Gazlar süperkritik akışkanlarla karışabilir ve mükemmel çözünürlüğe sahip olacakları söylenebilir. Bu durum gazların sıvılarla çözünürlüğü ile karşılaştırıldığında çözünürlük düşüktür ve sıcaklığın artırılmasıyla azalır (Oakes vd., 2001).

Karbondioksitin kritik sıcaklığının ($T_k=304,1$ K) ve kritik basıncının ($P_k=7,4$ MPa) düşük olması, yanıcı ve zehirli olmaması, diğer organik çözücülere göre çevreye zarar vermemesi özelliklerinden dolayı bu tür çalışmalarda tercih edilen bir çözücüdür. Ayrıca karbondioksitin ekstraksiyon sonunda sistemden kolaylıkla ayrılması ve geride atık bırakmaması ekstraksiyon işlemi sonunda ekstra bir işleme tabi tutulmasını gerektirmemektedir. (Çalimli, 2003). Karbondioksit geleneksel organik çözücülerle kıyaslandığında yüzey gerilimi oldukça düşük, yayınlığı büyük ve viskozitesi düşüktür. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu için gerekli ticari CO₂, gübre endüstrisi ve fermantasyon proseslerinden yan ürün olarak temin edilir. Bu yüzden çözücü olarak kullanımı atmosferde bulunan CO₂ miktarında hiçbir artışa neden olmadığından süperkritik çözücü olarak kullanımı fazladan bir “sera gazı etkisi” yaratmaz (Mukhopadhyay, 2000).

CO₂' in çözme gücünü etkileyen diğer bir parametre de polaritesidir. CO₂' in polaritesi zayıf polaritedeki çözücülere benzemektedir ve bu nedenle apolar çözücüler grubunda yer alır; ancak karbonun dört kutuplu moleküler yapısı nedeniyle alkol, ester,

aldehit gibi organik polar maddeleri sınırlı oranda çözebilmektedir. CO₂' in düşük dielektrik sabiti nedeniyle oluşan zayıf polaritesini arttırmak için polaritesi yüksek maddeler eklenebilir. Bu tür maddeler yardımcı çözücü olarak adlandırılır (Sanal, 2004). Genellikle bileşenlerin CO₂ ile ekstre edilebilirliği bileşikte bulunan fonksiyonel grupların varlığına, molekül ağırlıklarına ve polaritelerine bağlıdır (Mukhopadhyay, 2000). Çözününin uçuculuğu ne kadar yüksek olursa o kadar kolay uzaklaşır ve molekül ağırlığı arttıkça çözünürlük azalır (Özkal, 2004). Süperkritik CO₂'in çözme gücü aşağıda ifade edilmektedir:

- Apolar ve birkaç polar bileşiği çözebilir.
- Molekül ağırlığı düşük bileşenleri büyük oranda çözerken molekül ağırlığı arttıkça çözücü gücü azalır.
- Orta molekül ağırlıklı oksijenlenmiş organik bileşikler ile yüksek afiniteye sahiptir.
- Serbest yağ asitleri ve bunların gliserinleri CO₂ içinde düşük çözünürlüğe sahiptir.
- Pigmentler düşük çözünürlüğe sahiptir.
- 373 K' in altındaki sıcaklıklarda su düşük çözünürlüğe (%0,5 a/a) sahiptir.
- Protein, polisakkarit, şeker ve mineral tuzları çözmez.
- Uçuculuğu az olan bileşikleri molekül ağırlığının büyüklüğüne ve/veya daha polar olmasına göre basıncın artmasıyla ayırabilir (Brunner, 2005).

1.3.5.2. Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları

Süperkritik akışkan süreçleri, bilimsel ve teknolojik açıdan hızla gelişen bir alan haline gelmiştir (McHugh ve Krukoniş, 1986). Son yıllarda, Almanya başta olmak üzere ABD ve Japonya'da bu konuyla ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Çözünürlüğünün ayarlanabilir olmasından dolayı, süperkritik akışkanlar (başta süperkritik karbondioksit olmak üzere) ayırma ve saflaştırma, kromatografi, polimerizasyon ve fraksiyonlama, tanecik tasarımı, biyoteknoloji, yağların modifikasyonu, suların arıtılması gibi çok değişik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Özellikle, doğal ürünlerin süperkritik akışkan kullanılarak ekstrakte edilmesine, fraksiyonlanmasına veya

saflaştırılmasına dayalı olarak son 20 yıl içerisinde gerçekleştirilmiş araştırmalardan ve süreç geliştirme çalışmalarından elde edilen ümit verici sonuçlar araştırmacıları ekstraktif olmayan uygulama alanlarında da yoğun araştırmalara yöneltmiştir (Dinçer vd., 1998). Süperkritik akışkan uygulamaları endüstride daha çok geçmişte doğal maddelerin ekstraksiyonu, kahveden kafeinin giderilmesi, bitki tohumlarından yağ ekstraksiyonu, kömür ve petrolden kimyasal maddelerin ekstraksiyonu gibi süreçlere yoğunlaşmıştır (Sunol ve Beyler, 1990; Aktaş ve Olcay, 1996; Lepilleur vd., 1997; Cansel vd., 2003).

1.4. Bilinen *Colchicum* Türleri

Bu tez *Colchicum* türünden kolşisin alkaloidinin izolasyonuna yönelik çalışmaları içerdiğinden bu türler ayrı bir başlık altında toplanmıştır. Dünya genelinde pek çok *Colchicum* türü mevcuttur ve bu türler Tablo 3' de verilmiştir (URL-2, 2014).

Colchicum türlerinin soğanları ve tohumları, içerdiği alkaloid kolşisin nedeniyle tedavide ve tarımda kullanılmaktadır. Kolşisin, ateş düşürücü özelliğe sahiptir ve yıllardır gut hastalığının tedavisinde kullanılır. Son yıllarda da ailevi Akdeniz ateşi hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Klitschar vd., 1999). Kolşisin anti-mitoz ajan potansiyeline sahiptir ve çeşitli lipid türevleri oluşturarak lipid membranlar ile sıkı bir şekilde etkileşir (Mons vd., 2000). Ayrıca anti-tümör aktivitesine sahiptir ve kanser araştırmalarında faydalı bir laboratuvar aracıdır (Cavazza vd., 1999). Son olarak, kolşisin anti-fibrotik ilaçtır (Angelico vd., 2000) ve etkili bir genom eşleme ajanıdır (Barnabas vd., 1999). *Colchicum* cinslerinin tohumlarında ayrıca kolşikosid alkaloidi de mevcuttur. Kolşikosid, iskelet kaslarında rahatlatıcı bir etkiye sahip olan tiyokolşikosidin öncü molekülüdür. Ayrıca ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye de sahiptir. Bu yüzden, ortopedik, travmatik ve romatizmal rahatsızlıklarda uzun süredir kullanılmaktadır (Balduini vd., 1999). Kolşisin ayrıca zehirli bir bileşiktir. *Colchicum* cinslerinin tüketimi sonucu zehirlenme vakaları hatta intihar vakaları mevcuttur (Ellwood ve Robb, 1971; Allender, 1982; Danel vd., 2001; Weakley-Jones vd., 2001).

Tablo 3. Bilinen *Colchicum* taksonları

<i>Colchicum agrippinum</i>	<i>Colchicum fasciculare</i>	<i>Colchicum nanum</i>
<i>Colchicum alpinum</i>	<i>Colchicum feinbruniae</i>	<i>Colchicum neapolitanum</i>
<i>Colchicum androcymbioides</i>	<i>Colchicum figlalii</i>	<i>Colchicum parlatoris</i>
<i>Colchicum antepense</i>	<i>Colchicum filifolium</i>	<i>Colchicum parnassicum</i>
<i>Colchicum antilibanoticum</i>	<i>Colchicum freynii</i>	<i>Colchicum paschei</i>
<i>Colchicum arenarium</i>	<i>Colchicum gonarei</i>	<i>Colchicum peloponnesiacum</i>
<i>Colchicum arenasii</i>	<i>Colchicum graecum</i>	<i>Colchicum persicum</i>
<i>Colchicum asteranthum</i>	<i>Colchicum greuteri</i>	<i>Colchicum polyphyllum.</i>
<i>Colchicum atticum</i>	<i>Colchicum haynaldii</i>	<i>Colchicum pulchellum</i>
<i>Colchicum autumnale</i> L.	<i>Colchicum heldreichii</i>	<i>Colchicum pusillum</i>
<i>Colchicum balansae</i>	<i>Colchicum hierosolymitanum</i>	<i>Colchicum raddeanum</i>
<i>Colchicum baytopiorum</i>	<i>Colchicum hirsutum</i>	<i>Colchicum rausii</i>
<i>Colchicum bivonae</i>	<i>Colchicum hungaricum</i>	<i>Colchicum ritchei</i>
<i>Colchicum boissieri</i>	<i>Colchicum ignescens</i>	<i>Colchicum robustum</i>
<i>Colchicum bulbocodium</i>	<i>Colchicum imperatoris-friderici</i>	<i>Colchicum sanguicolle</i>
<i>Colchicum bulbocodium</i> alt tür <i>bulbocodium.</i>	<i>Colchicum inundatum</i>	<i>Colchicum schimperi</i>
<i>Colchicum bulbocodium</i> var. <i>edentatum</i>	<i>Colchicum kesselringii</i>	<i>Colchicum serpentinum</i>
<i>Colchicum bulbocodium</i> alt tür <i>versicolor</i>	<i>Colchicum kotschyi</i>	<i>Colchicum sfikasianum</i>
<i>Colchicum burttii</i>	<i>Colchicum kurdicum</i>	<i>Colchicum sieheanum</i>
<i>Colchicum chalcedonicum</i>	<i>Colchicum laetum</i> Steven	<i>Colchicum soboliferum</i>
<i>Colchicum chalcedonicum</i> alt tür <i>chalcedonicum.</i>	<i>Colchicum lagotum</i>	<i>Colchicum speciosum</i> Steven
<i>Colchicum chalcedonicum</i> alt tür <i>punctatum</i>	<i>Colchicum leptanthum</i>	<i>Colchicum stevenii</i>
<i>Colchicum chimonanthum</i>	<i>Colchicum lingulatum</i>	<i>Colchicum szovitsii</i>
<i>Colchicum chlorobasis</i>	<i>Colchicum lingulatum</i> alt tür <i>lingulatum.</i>	<i>Colchicum szovitsii</i> alt tür <i>brachyphyllum</i>
<i>Colchicum cilicicum</i>	<i>Colchicum lingulatum</i> alt tür <i>rigescens</i>	<i>Colchicum szovitsii</i> alt tür <i>szovitsii.</i>
<i>Colchicum confusum</i>	<i>Colchicum longifolium</i>	<i>Colchicum trigynum</i>
<i>Colchicum corsicum</i>	<i>Colchicum lusitanum</i>	<i>Colchicum triphyllum</i>
<i>Colchicum cretense</i>	<i>Colchicum luteum</i>	<i>Colchicum troodi</i>
<i>Colchicum crocifolium</i>	<i>Colchicum macedonicum</i>	<i>Colchicum tunicatum</i>
<i>Colchicum cupanii</i>	<i>Colchicum macrophyllum</i>	<i>Colchicum turcicum</i>
<i>Colchicum cupanii</i> alt tür <i>cupanii.</i>	<i>Colchicum manissadjianii</i>	<i>Colchicum tuviae</i>
<i>Colchicum cupanii</i> alt tür <i>glossophyllum</i>	<i>Colchicum micaceum</i>	<i>Colchicum umbrosum</i> Steven
<i>Colchicum davisii</i>	<i>Colchicum micranthum</i>	<i>Colchicum varians</i>
<i>Colchicum decaisnei</i>	<i>Colchicum minutum</i>	<i>Colchicum variegatum</i> L.
<i>Colchicum doerfleri</i>	<i>Colchicum mirzoevae</i>	<i>Colchicum wendelboi</i>
<i>Colchicum dolichantherum</i>	<i>Colchicum montanum</i> L.	<i>Colchicum woronowii</i>
<i>Colchicum eichleri</i>	<i>Colchicum multiflorum</i>	<i>Colchicum zahnii</i>
<i>Colchicum euboicum</i>	<i>Colchicum munzurense</i>	

Bitkinin Latince ismi olan *Colchicum*, “Colchis” (Kolkhis) kelimesinden gelmektedir. Bu isim Doğu Karadeniz ile Güney Kafkasya arasındaki bölgenin eski ismidir. *Colchicum speciosum* türü bu bölgede yaygın olarak yetişmektedir (Baytop, 1999). 27 tür (28 takson) sonbaharda, 8 tür ise erken ilkbaharda çiçek açmaktadır. Cins toplam 35 türden (36 takson) oluşur ve bunların 15 tanesi Türkiye için endemiktir (Akan ve Eker, 2005). Bazı türler belirli bölgelerde yaygın ve bol olarak yetişmektedir. Örneğin *C. speciosum* Steven Kuzey-Anadolu’ da, *C. lptschy* Boiss. Güney-Doğu Anadolu’ da geniş yayılış gösterir (Davis, 1984). Kolşisin, çok eskiden beri bilinen ve kullanılan bir ilaç hammaddesidir ve genellikle *Colchicum autumnale* L.’ den elde edilir. Ancak günümüzde kolşisin elde etmek için daha yaygın ve bol olarak yetişen başka *Colchicum* türlerinin tohumları veya kolşisin içeren *Gloriosa superba* gibi diğer bitki türleri de kullanılmaktadır (Pandey ve Banik, 2012).

1.4.1. *Colchicum speciosum* Steven (Acı Çiğdem)

Colchicum türü *Liliaceae* familyasında yer alan gövdesiz, çok yıllık bir bitkidir. Toprak altı organı yumruludur (Şekil 5). Yapraklar tabanda, eliptik veya dikdörtgen şeklindedir. Tohumlar genellikle Mayıs-Haziran aylarında olgunlaştıktan sonra kaybolurlar. Çiçekler tek veya grup halinde morumsu pembe, pembe veya menekşe mor renklidirler (Şekil 6). Stamen (erkek üreme organı) altı tane, filamentler (sap kısmı) sarımsı beyaz renktedir. Meyve toprak yüzeyinde olgunlaşan üç gözlü, çok tohumlu, septisit kapsül şeklindedir (Şekil.7). Çok geniş alanlarda yayılış gösterirler (Şekil 8) (Brickell, 1984).

Colchicum türleri, zehirli alkaloidler içerdiklerinden dolayı insan ve hayvanlar için çok tehlikelidir. Tohumlarında mevcut olan ve ilaç olarak kullanılabilen alkaloidler ancak doktor kontrolünde kullanılmalıdır. Zigana dağlarında yetişen acı çiğdem tohumlarında yaklaşık % 0,41 oranında kolşisin maddesi saptanmıştır. Bu madde çok eski zamanlardan beri kandaki üre miktarını düşürmek için kullanılmaktadır. (Baytop, 1963; Baytop, 1984).

Colchicum speciosum' un biyolojik sınıflandırılması:

Alem : Bitkiler
Bölüm : Kapalı tohumlu
Sınıf : Bir çenekli
Takım : Liliales
Familya : Liliaceae
Cins : *Colchicum*
Tür : *Colchicum speciosum* (URL-3, 2014)



Şekil 5. *Colchicum speciosum* bitkisinin toprak altı organı



Şekil 6. *Colchicum speciosum* bitkisinin çiçekli görünümü



Şekil 7. *Colchicum speciosum* bitkisinde kapsül meyve



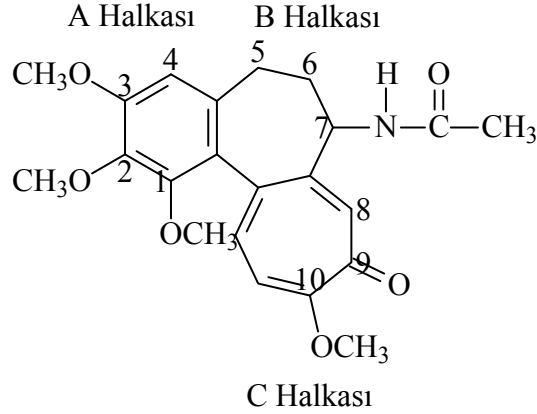
Şekil 8. *Colchicum speciosum* bitkisinin yayılış alanından bir görünüm

1.4.2. Kolşisin

“Hiç bir acı bundan daha şiddetli değildir; ne vücuda demir vidalar saplanması, ne de kırbaçlanmak, ne bir hançer yarası ne de vücudun yanması”. Bu acıyı, ikinci yüzyıl Yunan hekimi Aretaeus’ un tanımladığı şekilde hayal edin. 17. Yüzyıl hekimi Thomas Sydenham bu acıyı, bağların şiddetli bir şekilde gerilmesi ve yırtılması, bir köpeğin bacağına kemirmesi olarak tanımlamaktadır (Weede, 1984). Bu açıklamaların kaynağı gut hastalığıdır. Gut hastalığının en önemli belirtisi ayak başparmağı eklemine yoğun bir şekilde ağrması ve yanmasıdır. Uzun geçmişinden dolayı gut, birçok etkili ve çok etkili olmayan tedavi yöntemlerinin hedefi haline gelmiştir. Çok etkili olmayan tedavi yöntemlerinin bazıları, dinlenme ve rahatlama, şarap ya da alkollü içeceklerin tüketimidir. Modern tıbbın gelmesiyle birlikte probenesid, allopurinol, kortizon ve ibuprofen ve indometasin gibi steroid olmayan ateş düşürücü ilaçlar (NSAIDS) gibi daha etkili yöntemler geliştirilmiştir. Aslında, gut hastalığının tedavisinde uzun bir geçmişe sahip olan en etkili antigut ajanı kolşisindir.

Farmakolojik olarak aktif bileşen olan (-)-kolşisin 1820 yılında Fransız kimyagerler Pelletier ve Caventon tarafından izole edildi (Pelletier ve Caventon, 1820). Kolşisinin tam

yapısı Corrodi ve Hardegger (1955) tarafından belirlendi. Şekil 9’ da görüldüğü gibi Kolşisin bir trimetoksifenil halkası (A halkası), 7 pozisyonunda asetamite sahip yedi üyeli bir halka (B halkası) ve bir tropolonik halkası (C halkası) içeren trisiklik bir alkaloiddir.



Şekil 9. Kolşisinin yapı formülü

Çoğu kolşisin araştırmasının sebebi, genellikle zengin yaşam hastalığı olarak düşünülen gut hastalığının sebebini daha iyi anlamak üzerinedir. Latince “gutta” (damla) isminden gelir. Hekimler bu hastalığı, ayak başparmağının iltihaplanması gibi belirtilerinden tanırlar (Weede, 1984). Hiperürikoz üri ya da kandaki ürik asit miktarının artması gut hastalığının genel belirtilerine sebep olur (Katzung, 1995; Voet ve Voet, 1990). Ürik asit insanlarda ve diğer canlılarda pürinlerin son parçalanma ürünleridir. Bu metabolik yolun enzimatik eksiklik ya da diyet pürinlerinin artması sebebiyle bozulması sonucu ürik asit kandan etkili bir şekilde uzaklaştırılmaz. Az çözünür bir madde olan ürik asit kristallenir ve bu duruma ilk tepki makrofajlar ve akyuvarlardan gelir. Ürat kristallerinin makrofajlar ve akyuvarlar tarafından fagositozu, sitokinlerin ve interlökinlerin salınımını uyarır. Bu durum ateşlenmeye ve bazı belirgin belirtilere yol açar.

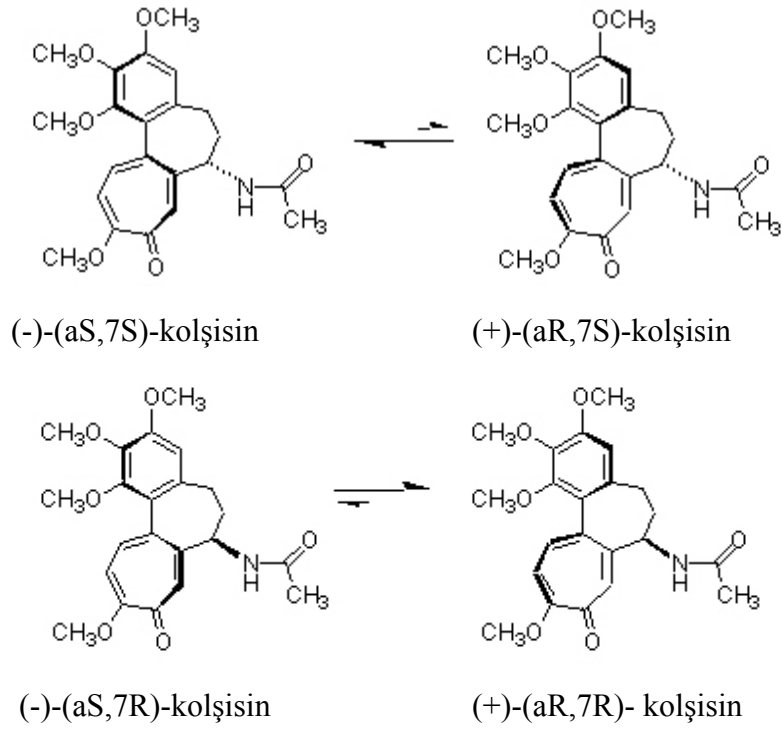
Kolşisinin, gut hastalığının verdiği büyük acıları nasıl azalttığının kesin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Katzung, 1995). Bununla birlikte, bu ağrının azaltılması kolşisinin en önemli etkilerinden biri olan tübülün dimerlerine bağlanması olduğu düşünülmektedir. Tübülün (moleküler ağırlığı yaklaşık 10000 Dalton) alfa ve beta olmak üzere iki formu olan bir proteindir. Alfa ve beta tübülün formları, mikrotübüllerin uzun filamanlarını oluşturmak üzere polimerize olurlar. Kolşisin tübülün dimerlerine

bağlandığında dimerler mikrotübülleri oluşturamaz. Mikrotübüller mitoz ve mayoz bölünmede, iğ ipliklerinin oluşumunda, vesiküllerin ve proteinlerin hücre içi taşınmalarında, ameoboid harekette (amip hareketi) ve diğer hücrel işlemlerde hayati öneme sahiptirler. Ameoboid hareketin inhibisyonu, makrofajların ve akyuvarların göçünü ve fagositozunu engeller. Bu sebepten dolayı ateşlenmeyi ve gut ağrısını dindirdiği düşünülmektedir. Ayrıca kolşisin mitozu metafaz evresinde durdurduğundan dolayı, bilim adamları tarafından anti-kanser ajanı olarak da değerlendirilir. Bununla birlikte, kolşisin ciddi zehirlenmelere sebep olduğu için antineoplastik uygulamalarda pek kullanılmaz.

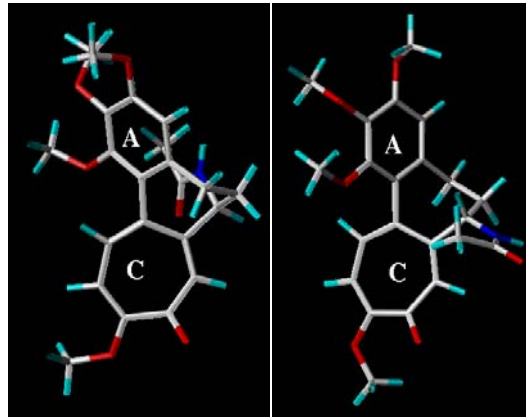
Bu moleküler asimetri ışığında, Şekil 10' da görüldüğü gibi kolşisin 4 stereoizomere sahiptir. Her bir çift C-7 karbonunda R ve S yapılarına sahiptir. (-)-(aS,7S)-Kolşisin doğal izomerdir ve yeterli enerji verildiğinde birbirlerine dönüşebilirler. Kolşisinin dönüşümünün enerji bariyeri yaklaşık 22-24 kcal/mol' dür (Boye ve Brossi, 1992). Bu enerji, konformasyonların stereoizomer olarak izolasyonu ve sentezine imkân verecek bir büyüklüktür. Bu konuda birçok tıbbi kimyager araştırma yapmıştır. Bunlardan biri olan Arnold Brossi, saat yönünün tersine olan aS konformasyonunun doğal olarak oluşan alkaloit olduğu sonucuna varmıştır (Wildman, 1960; Carpraro ve Brossi, 1984; Brossi, 1990; Boye ve Brossi, 1992;). Şekil 11' de (7S)-kolşisinin minimum enerjili modelleri görülmektedir. İki konformasyonda da asetamit grubunun çok farklı bir şekilde dizildiğine dikkat ediniz.

Kolşisin, gut hastalığının tedavisindeki (Box ve Wilson, 1951; Kints vd., 1997; Milne ve Meek, 1998; Klintschar vd., 1999; Larrubia vd., 2003; Sussman vd., 2004; Deveaux vd., 2004;) kullanımının yanı sıra siroz (Roberts vd., 1977), ailevi Akdeniz ateşi (Goldfinger, 1972; Kershenobich vd., 1988; Klintschar vd., 1999), tifüs, kolera, kalınbağırsak rahatsızlıkları, deri şikayetleri (Chaudhuri ve Thakur, 1994) gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Kolşisin, ülkemizde Dr. F. Frik ilaç sanayi A.Ş. tarafından Colchicum-Dispert Draje adı altında (URL-4, 2014) ve İ.E. Ulagay ilaç sanayi Türk A.Ş. tarafından da Kolsin (URL-5, 2014) adı altında, ilaç tabletleri haline getirilerek satılmaktadır. Ayrıca çeşitli kolşisin satış sitelerinde 1 gram kolşisin 150-250 \$ (URL-6, 2014), 0,5 mg kolşisin içeren 90 adet tablet 43,20 \$' a (URL-7, 2014) satılmaktadır. Bu fiyatlar, kolşisinin ne kadar değerli bir ürün olduğunu göstermektedir.



Şekil 10. Kolşisinin stereoizomerleri



Şekil 11. (aS, 7S)-kolşisin (solda) ve (aR,7S)-kolşisin (sağda)

1.4.3. Kolşisin İzolasyonuna Yönelik Literatür Araştırması

Kolşisinin ekstraksiyonu için geniş bir literatür araştırması yapılmış olup sınırlı sayıda bilimsel makaleye ulaşılmıştır. Bu makalelerin bir kısmı kolşisinin farklı bitkilerden izolasyonu üzerine olup aşağıda detayları sunulmuştur.

Bu çalışmalardan en önemlisi Ellington ve ark. (2003) tarafından yapılmıştır. *Colchicum autumnale* L.' den kolşisin, 3-demetilkolşisin ve kolşikosid'in, süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi ile kazanımı araştırılmıştır. Uygulanan ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar geleneksel yöntemler ile karşılaştırılmıştır.

Geleneksel ekstraksiyon yönteminde 200 mg kadar toz haline getirilmiş tohum 10 mL petrol eteri ile yağı uzaklaştırmak için çalkalanmış ve dekantasyon ile petrol eteri ayrılmıştır. Kalıntı 10 mL metanol:su (95:5) ile oda sıcaklığında 24 saat ekstre edilmiş ve ekstraksiyon sırasında 3 kez 30' ar dakika ultrasonik banyoda sonikasyon yapılmıştır. Daha sonra ekstrakt 85 G' de santrifüj edilmiş, aerodisk naylon filtreden geçirildikten sonra HPLC' de analiz edilmiştir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle (çalkalama, soksilet, geri soğutucu, ultrasonik banyo) yaklaşık %1,5 alkaloid karışımı elde edilmiş ve bu alkaloid karışımının da %0,85 kolşisin, %0,10 3-demetil kolşisin ve %0,57 kolşikosid içerdiği belirlenmiştir.

Süperkritik ekstraksiyon için basınç, sıcaklık, modifiyer yüzdesi ve ekstraksiyon süresi incelenmiştir. Sonuç olarak optimum ekstraksiyon şartları 0,90 g/mL (247 bar) karbondioksit yoğunluğu, 1,5 mL/dk karbondioksit akış hızı, modifiyer olarak %3 metanol, sıcaklık 35 °C, statik ekstraksiyon süresi 25 dakika, dinamik ekstraksiyon süresi 30 dakika olarak bulunmuştur. Bu alkaloidlerin kantitatif analizleri HPLC ile yapılmış ve geri kazanım yaklaşık olarak %98 bulunmuştur. Veriler maserasyon ve sonikasyon gibi geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Her iki ekstraksiyon yönteminde de hemen hemen aynı miktarda alkaloid elde edildiği rapor edilmektedir. Ancak süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemi geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha etkili, daha hızlı ve daha çevreci bir ekstraksiyon yöntemi olarak önerilmektedir. Bu yöntemle yaklaşık %1,2 kolşisin içeren ham karışım elde edildiği rapor edilmiştir.

Kannan ve ark. (2007) yaklaşık %1 kolşisin içeren kurutulmuş ve kabaca toz haline getirilmiş *Gloriosa superba* tohumlarının 100 gramını metanol-su karışımı ile (0:100; 10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 80:20; 90:10; 100:0) her biri 6 tekrar olacak şekilde ekstre etmiştir. Her deneme ve tekrar için tohumlar 400 mL çözücü bileşimi ile 6 saat kadar çalkalanmıştır. Ekstrakte edilen tohumun çözücüsü rotary evaporatör ile 55 °C' de 0 mmHg basınçta hacminin yarısına kadar konsantre edilmiş daha sonra 200 mL hekzan ile yağı alınmış ve hekzan fazı ayrılmıştır. Kalan kısmın pH'ı derişik HCl ile 3,5' a düşürülmüş ve çözelti daha sonra 200 mL kloroform ile ekstrakte edilerek kloroform fazı 45 °C' de 0 mmHg basınçta uçurulmuş ve kolşisin içeren ham karışım elde edilmiştir.

Kolşisin varlığı ince tabaka kromatografisinde (İTK) kolşisin standardı ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Hareketli faz olarak toluen:metanol (70:30) kullanılmıştır. İzolasyon işlemi kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve izolasyon esnasında 50cmx2cm' lik cam kolon, sabit faz olarak nötral alümina, hareketli faz olarak da kloroform ve toluen (97:3) kullanılmıştır. En yüksek kolşisin miktarı %100 metanolün kullanıldığı çözücülerde elde edilmiş ve bu değer %0,816 olarak bulunmuştur. Ancak 50:50 metanol-su karışımı oranlarının üzerinde metanol yüzdesinin artması elde edilen kolşisin miktarında fazla bir artış sağlamadığı rapor edilmektedir.

Bir başka çalışmada, Josi ve ark. (2010) *Gloriosa superba* tohumlarını (3 kg) 9 L 90% lık metanol ile 70-75°C'de üç kez ekstre etmiş (her biri 3 saat) ve oda sıcaklığına soğutulan ekstraktın vakum altında evaporatörde 2 litreye yoğunlaştırılması sonrası 1 litre su eklenmiştir. Daha sonra hekzan ile ekstre edilmiş fazlar ayrılarak sulu faz yeniden diklorometan ile kısımlandırılmıştır (11 L x2 kez). Diklorometan fazı ayrıldıktan sonra önce %3'lük NaOH çözeltisi ile daha sonra %1'lik asetik asit çözeltisiyle ve son olarak da damıtık su ile çalkalanarak fenolik safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Dikloro metan evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra kalan ekstrakt etil alkol içinde çözülerek aktif karbon doldurulmuş kolon içinden geçirilmiştir. Bu işlemle tekrar safsızlıklardan ayrılan etil alkol fazı bu kez alümina içeren kolondan geçirilmiştir. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı diklorometan da yeniden çözülerek yeni bir nötral alümina kolondan geçirilmiştir. 40 °C'de evaporasyondan sonra kalıntı etil asetat içinde kristallendirilerek saf kolşisin ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların ateş düşürücü aktiviteleri fare deneyleriyle test edilmiştir.

Pandey ve Banik (2012) kolşisinin, *Gloriosa superba* bitki yumrusundan ekstraksiyonu sırasında etkili olabilecek sıcaklık, zaman, ortalama parçacık boyutu, çözücü-katı madde oranı, çözücü bileşeni, pH ve ekstraksiyon basamakları gibi parametreleri incelemiş ve bunlar arasından ekstraksiyon süresi, parçacık boyutu, çözücü-katı madde oranı ve solvent bileşiminin önemli etkileri olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak optimum ekstraksiyon şartlarını 35 °C sıcaklık, pH=7, ekstraksiyon süresi 70 dakika, çözücü-katı madde oranı 50:1, ortalama parçacık boyutu 0,5 mm ve çözücü bileşimi etanol-su (70:30) olarak bulmuşlardır. Bu optimum şartlarda elde edilen maksimum kolşisin miktarı bitki yumrusunun kuru ağırlığının %0,91 i olarak belirlenmiştir (tahmin edilen değer yumruların kuru ağırlığının %0,97'si). Kolşisinin kantitatif tayini HP-İTK (yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi) ile yapılmıştır. Bunun için silikajel F₂₅₄

alüminyum tabakaların üzerine numuneler uygulanmıştır. Hareketli faz olarak toluen ve metanol (85:15 v/v) kullanılarak kantitatif tayin densitometri ile yapılmıştır. Ancak izolasyon konusunda bir çalışma rapor edilmemiştir.

Ülkemizde *Colchicum* tohumlarından kolşisinin izolasyonu amacıyla Prof. Dr. Metin Tanker, Prof. Dr. Mehmet Koyuncu ve Prof. Dr. Maksut Coşkun (1994) tarafından yürütülen Tübitak destekli bir projede kolşisinin içeriği ve izolasyonuna yönelik çalışmalar rapor edilmiştir. Aynı grup tarafından Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen bir başka projede de *Colchicum* türlerinden tedavide kullanılmak amacıyla standart *Colchicum* tohumu ekstresinin hazırlanması ve kolşisinin elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Tanker vd., 2000). Bu çalışmalardan üretilen bir makalede (Güvenç vd., 1998) *Colchicum cilicicum* (Boiss.) Dammer, *Colchicum kotschyi* Boiss., *Colchicum speciosum* Steven ve *Colchicum bornmuelleri* Freyn'in kolşisinin içerikleri rapor edilmiştir. Türkiye'de yetişen *Colchicum* türlerinin kolşisinin içerikleri genel olarak bilinen *C. autumnale* ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu projelerden elde edilen veriler uluslararası kongrelerde (Tanker vd., 1995; Coşkun vd., 2000) de sunulmuştur. Her iki proje sonucunda toplanan *Colchicum* tohumlarından kolşisinin izole etmek için uygulanan yöntemlerin ekonomik olamayacağı özellikle tohumların çok sert olduğu ve toz haline getirilmesinin maliyetli olduğu belirtilmektedir (kişisel görüşme). Ancak her iki projede de öğütme için değirmen kullanılmış ve bu işlem zaman alıcı ve zahmetli olmuştur. Bu çalışma sonucunda yaklaşık %0,21 kolşisinin içeren ham karışım elde edildiği rapor edilmiştir.

1.5. Çalışmanın Amacı

Ülkemiz doğal kaynaklar bakımından çok zengin olmasına karşın, bu zenginliklerin ekonomiye kazandırılmasında maalesef yetersiz kalmaktadır. Dünyada başka bölgelerde bulunmayan pek çok bitki türü özellikle endemik bitkiler ihraç edilmekte işlendikten sonra tekrar yurdumuza hammadde veya işlenmiş ürün olarak ithal edilmektedir. Doğal ürünlerin yurt içinde işlenmesi bu ürünleri hem ekonomiye kazandıracak hem de işlenmiş haliyle çok yüksek maliyetlere satın alınmasını engelleyecek bir yaklaşımdır. Çalışmadan elde edilecek veriler doğrultusunda ekonomik ve kolay uygulanabilir bir izolasyon sistemi geliştirildiği takdirde ülkemizde yetişen ve ihraç edilen doğal kaynaklarımız katma değeri yüksek bir ürün olarak ekonomiye kazandırılabilir.

Ülkemizde, başlıca *Colchicum speciosum* türü olmak üzere birçok *Colchicum* cinsi bitki yetişmektedir. Bu türler içerdikleri alkaloidler sebebi ile çok değerli bitkilerdir. Bu alkaloidlerden en önemlisi gut hastalığı, ailevi Akdeniz ateşi hastalığı, Behçet hastalığı gibi yaygın rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan kolşisin alkaloididir. Bu bitkiler, içeriğindeki kolşisini izole etmek üzere toplanıp işlenmekte ve izole edilen kolşisin ticari bir ürün olarak günümüzde farklı firmaların adı altında kullanılmaktadır. Ülkemizde ise bu bitkinin tohumlarından kolşisin izolasyonu yapılmamaktadır. Bitki tohumları toplanıp yurtdışında çeşitli ülkelere düşük fiyatlarda ihraç edilmektedir. Bu bitkilerden kolşisin izole edilip ilaç haline getirildikten sonra ülkemize çok yüksek rakamlarda geri satılmaktadır ve ülke ekonomisine büyük bir yük bindirmektedir. Bu bitkilerin ihracatını yapan Bilginler firması (Sürmene, Trabzon), ihraç edilen bu tohumların kolşisin izolasyonunun kendi laboratuvarımızda yapılıp yapılamayacağını talep etmişlerdir. Bu bağlamda bu çalışmanın amacı bu bitkilerin kolşisin izolasyonunun yapılabileceği kolay uygulanabilir, düşük maliyetli bir ekstraksiyon ve kolon izolasyon yöntemi geliştirmektir. Ekstraksiyon için, katı-sıvı ekstraksiyonu kullanılarak çözücü hacmi ve çalkalama zamanının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca modifiyerli ve modifiyersiz olmak üzere süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi (SFE) ile ekstraksiyon işlemi amaçlanmıştır. Kolon kromatografisi için silika, poliamid ve selüloz kolon dolgu maddelerinin etkinliği ve en uygun kolon elüsyon çözücü sisteminin belirlenmesine yönelik çalışmalar hedeflenmiştir. Her bir ekstraktın, önce ince tabaka kromatografisinde (İTK) daha sonra da yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) saflık kontrolleri gerçekleştirilecektir. Çalışma sonunda, tohumların içeriğindeki toplam alkaloid miktarı ve kolşisin alkaloid miktarı belirlenmiş olacaktır ve en uygun ekstraksiyon ve kolon izolasyon sistemi belirlenecektir.

Ayrıca tohumların içerisinde önemli miktarda yağ bulunmaktadır. Yağ gıda endüstrisinde, kozmetik sanayinde, sabun yapımında ve biyodizel yapımında kullanılması mümkündür. Bu sebeple, bu tohumlarının asıl kullanım amacının dışında katma değeri yüksek yan ürünler elde edilebilirliği de araştırma hedefleri içinde yer almaktadır.

2. MATERYAL METOD

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Laboratuvar çalışmaları boyunca tüm kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup kullanım amaçları ve markaları Tablo 4’ de verilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün çözeltiler saf su içerisinde hazırlanmıştır.

Tablo 4. Kullanılan kimyasallar, kullanım amaçları ve markaları

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı	Marka
Metanol	Ekstraksiyon	Sigma Aldrich
Petrol eteri	Yağ ekstraksiyonu	J.T. Baker
MgSO ₄	Kurutucu	Merck
Etil asetat	Kolon hareketli faz	Merck
Asetonitril	HPLC hareketli fazı	Merck
Hexan	Kolon hareketli faz	Merck
Silika	Kolon dolgu maddesi	Merck
Poliamid	Kolon dolgu maddesi	Macherey Nagel
Selüloz	Kolon dolgu maddesi	Sigma-Aldrich

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar sırasında faydalanılan cihazlar ve markaları Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Marka
Hassas terazi	Ohaus PA 214C
Çalkalayıcı	Heidolph Promax 2020
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810
Ultrasonic banyo	Elma D-78224
Evaporatör	Heidolph
Vakum Pompası	ILMVAC
0,40 µm filtre	Gelman Sciences
UV-Görünür bölge lamba	UVGL 58
HPLC	Hitachi
HPLC enjektörü	Hitachi L-2200
HPLC pompası	Hitachi L-2130

Tablonun devamı

HPLC kolon fırını	Hitachi L-2300
HPLC DAD dedektör	Hitachi L-2455
Süperkritik akışkan ekstraktör	Applied Separation
Süperkritik modifiyer pompa	Applied Separation Series 1500
Süperkritik basınç pompası	Atlas Copco GX-4FF
Süperkritik Soğutucu	Applied Separation Polyscience
Halkalı öğütücü	Ünal MRK.
GC sistemi	Agilent 6890N
FID dedektörü	Agilent 5973 network

2.3. Deneysel Çalışmalar

2.3.1. Tohumların Toplanması ve Öğütülmesi

Colchicum tohumları, 2012 yılında Trabzon-Sürmene kırsalında köylüler tarafından satışı yapılmak üzere toplanan tohumlardır. Bilginler firmasının talebi doğrultusunda Mayıs 2012 döneminde farklı bölgelerden toplanmıştır. Tohumların büyük bir çoğunluğu *Colchicum speciosum* olmakla beraber, diğer türlerin tohumlarının da karışma ihtimali yüksektir. Tüm tohumların fiziksel görünüşleri aynı olduğundan bir ayırım yapmak mümkün olmamıştır.

Bitki tohumları 1,5-2 mm boyutlarında olup renkleri kahverengidir. Taneler çok sert olduğundan, basit öğütme ve ezme işlemleri yetersiz kalmıştır. Bu nedenle tohumlar ilk olarak, jeoloji mühendislerinin kullandığı halkalı öğütücü cihazında toz haline getirildi.

2.3.2. Yağ Ekstraksiyonu

Öğütülmüş tohumlar ilk olarak petrol eteri ile çalkalanarak yağ ekstraksiyonu yapıldı. Bunun için, 8 g tohum tartıldı. Aşırı miktarda petrol eteri ile 30 dakika çalkalandı. Katı materyalin dibe çökmesi beklendi ve daha sonra dekantasyon yapılarak üstteki yağ içeren petrol eteri alındı. Bu kısım 3900 devir/dk' da 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Daha sonra petrol eteri fazı 400 mbar basınçta 40 C° de evaporatörde uzaklaştırılarak tohumdaki yağ elde edildi. Bu işlem için 400 mL ve 150 mL petrol eteri ile ekstraksiyon yapılarak yağ verimleri belirlendi. Yağ ekstraktının bileşen analizi alev iyonlaşma dedektörlü (FID) bir gaz kromatografisi (GC) cihazı ile gerçekleştirildi. Yağ asitlerinin belirlenmesinde ön bir esterleşme işlemi yapıldı. Bu işlem için 1 mL yağın üzerine BF₃-

metanol-toluen karışımı eklendi. 100 °C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine hekzan- saf su karışımı eklendi ve 2 dakika santrifüj yapıldı. Üstte kalan faz alındı ve bu fazın çözücüsü azot gazı ile uçuruldu.

GC-FID analiz parametreleri aşağıda belirtilmiştir:

- Kolon : 60mx225µmx0,25µm
- Kolon sıcaklığı : 50 °C' den 230 °C' ye 34 dk' da ve bu sıcaklıkta 31 dakika analiz.
- Akış hızı : 1,4 mL/dk
- Enjeksiyon hacmi : 1 µL
- Taşıyıcı gaz : H₂ gazı ve kuru hava

2.3.3. Sıvı Ekstraksiyonuyla Kolşisinlerin Ayrılması

Toz haline getirilen tohumların yağı alındıktan sonra kolşisinlerin ekstraksiyonunda *Colchicum autumnale* için önerilen ekstraksiyon yöntemi kullanıldı (Ellington vd., 2003). Bu yöntem mevcut çalışmada optimize edilmiştir.

2.3.3.1. Kolşisin Ekstraksiyonu İçin Çözücü Hacmi Optimizasyonu

Yağı uzaklaştırılan tohumlara farklı hacimlerde çözücü ekstraksiyon işlemi uygulandı. Bu amaçla 95:5 metanol-su karışımının 100, 150, 200, 250 ve 300 mL' lik hacimleri ile tohumlar 24 saat çalkalandı. Bu süre içerisinde örnekler iki kez 30 dakikalık süreçte ultrasonik banyoda ultrasonik işleme tabi tutuldu. Çalkalama işlemi sonunda süzme işlemi yapıldı ve çözücü tohumlardan ayrıldı. Çok ince taneli, süzgeç kağıdından geçebilen tohumları ayırmak için 3900 devir/dk' da 5 dk santrifüj yapıldı. Süzüntü 300 mbar 50 C^o de evaporatörde kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Ancak çözücü sisteminde bulunan su tam olarak uzaklaştırılmadığından, kalıntı yaklaşık 15 mL metanolde tekrar çözüldü ve susuz MgSO₄ eklenerek kurutma işlemi gerçekleştirildi. Bu esnada ekstraktın ince tabaka kromatografisi (İTK) ile analizleri yapılarak ve ekstraksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Daha sonra çözücü dekantasyonla alındı ve 0,40 µm' lik süzgeçlerden süzüldü. Çözücü uzaklaştırılarak ham alkaloit karışımı elde edildi. Tartım

yapıldı ve ekstraksiyon verimleri hesaplandı. Son olarak bu karışımlardan, 1 mg/mL' lik stok çözeltiler hazırlandı ve HPLC analizleri yapıldı.

2.3.3.2. Kolşisin Ekstraksiyonu İçin Çalkalama Süresi Optimizasyonu

Bölüm 2.3.3.1.' de belirtilen çalışmalar doğrultusunda uygun çözücü sistemi belirlendikten sonra 24 saat olan çalkalama süresini kısaltmaya yönelik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 12 saatlik çalkalama ve bu süreçlerde bir kez 30 dakikalık ultrasonik işlem uygulandı. Geri kalan bütün işlemler aynen tekrarlandı. Ekstraksiyon işlemi sonrası aşamalar, ayırma ve ekstraksiyon işlemleri yukarıda tanımlandığı şekilde uygulandı.

2.3.4. İnce Tabaka Kromatografisi

İTK için silika jel 64 F₂₅₄ floresans tabakalar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak 100:13,5:10 etil asetat-metanol-su karışımı kullanıldı. Ekstraksiyon ve kolon sonunda elde edilen örnekler İTK' ye standart ile birlikte yüklendi. Yürütücü tankın çözücü buharı ile doymuş hale gelmesi beklendi ve hareketli fazda yürütme yapıldı. Yürütmeler yapıldıktan sonra tabakalar UV lamba altında 254 nm' de kontrol edildi.

2.3.5. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi için silika jel 60 (63 µm), poliamid (0,10-0,3 mm) ve selüloz (20 µm) kolon dolgu maddeleri test edildi ve 50 cm boyunda 3 cm çapında cam kolon kullanıldı. Dolgu maddeleri 15-20 cm olacak ve içinde hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolona dolduruldu. Daha sonra numune yine aynı kolon dolgu maddesine emdirilip kurutularak kolona yüklendi. Etil asetat, metanol, su ve hekzan çözelti karışımlarının çeşitli oranları kullanılarak uygun çözücü sistemleri oluşturuldu. Kolon esnasında izolasyonun yapıp yapılmadığı İTK ile izlendi. Kolşisin içeren tüpler darası bilinen bir balonda toplandı, çözücüsü uçuruldu ve saf kolşisin elde edildi. Elde edilen bu kalıntının saf olup olmadığı, 1mg/ml' lik test örnekleri hazırlanarak HPLC' de analiz edildi. Silika jelin kullanıldığı kolon çalışmalarında üç farklı izolasyon sistemi kullanıldı. Bu sistemlerde

benzer çözücüler kullanılmakla beraber bileşim oranları ve uygulama şekilleri farklı tutuldu.

Silikajel-1

İlk olarak silika jel kolon dolgusunu şartlandırmak amacıyla 20 mL kadar etil asetat kolondan geçirildi. Mümkün olan en düşük metanol hacminde çözülen kolşisin ekstraktı silika jele emdirildi ve dikkatli bir şekilde kolonun üzerinden dolgu maddesi üzerine uygulandı. Etil asetat kısımları kolondan geçirildi. 2-3 mL' lik eluentler toplandı. Kolşisin fraksiyonu gelmeye başladıktan sonra çözücü polaritesi arttırıldı. 100:5:0,5 oranında etil asetat-metanol-su karışımı hazırlanarak kolona devam edildi. Yaklaşık 50 mL kadar bu oranda çözelti geçirildi. Ardından çözücü oranı 100:13,5:10' a (etil asetat-metanol-su) çıkartılıp yaklaşık 25 mL bu çözücü kolondan geçirilerek daha polar fraksiyonlar toplandı. Son olarak 100:5 metanol-su ile en polar fraksiyon ayrıldı. İşlem sırasında İTK ve HPLC ile kontroller yapıldı.

Yukarıda detayları verilen kolon izolasyon işlemleri poliamid ve selüloz kolon dolgu materyalleri için de tekrar edildi.

Silika jel-2

Silika jel dolgu materyalinin kullanıldığı izolasyon işleminde daha iyi bir kolşisin izolasyonu gerçekleştirmek için eluent olarak sadece etil asetatın kullanıldığı bir izolasyon işlemi daha yapıldı. Bu çalışmada kolşisin ve 3-demetil kolşisin izolasyonu için kolondan sadece etil asetat geçirildi. Daha polar bileşikler izole etmek amacıyla kolondan metanol geçirildi. İzolasyon aşamaları İTK ve HPLC ile kontrol edildi.

Silika jel-3

Silika jel dolgu materyaliyle çok daha düşük polariteli bir çözücü sistemi kullanılarak izolasyon işlemleri tekrar yapıldı. Bu amaçla çözücü polaritesi başlangıçta çok düşük tutuldu. Etil asetat ve hekzan 20:80 kullanılarak polarite indeksi 1' e düşürüldü ve bu çözücü sistemi kolondan geçirildi. Daha sonra bu oranlar 30:70, 50:50, 80:20 etil asetat-

hekzan olacak şekilde değiştirilip fraksiyonlar toplandı. Son olarak kolondan metanol geçirilerek polar fraksiyonlar toplandı.

2.3.6. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)

Toz haline getirilen *Colchicum* tohumları SFE ile ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Bunun için modifiyerli ve modifiyersiz ekstraksiyon işlemleri uygulandı. Ekstraksiyon işlemi için gerekli parametreler literatür verileri kullanılarak oluşturuldu ve deneylerde bu parametreler kullanıldı (Ernesto ve Ellington, 2003).

Örnek Kütlesi	: 10,8 g
Sıcaklık	: 35 C°
CO ₂ akış hızı	: 1,50 mL/dk
CO ₂ yoğunluğu	: 0,90 g/mL (247 bar)
Modifiyer	: Çeşitli oranlarda modifiyer kullanıldı.
Vessel hacmi	: 0,50 L

Bu çalışmada ilk önce çeşitli zaman aralıklarında (1, 3, 5 saat) modifiyersiz ekstraksiyon işlemi yapıldı. Modifiyerli çalışmalarda ise süperkritik CO₂' in akış hızı 1,5 mL/dk iken, içinden 0,06, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 mL/dk olacak şekilde metanol geçirilerek modifiyerli ekstraksiyon yapıldı. Modifiyersiz ekstraksiyon sonunda toplanan kuru ekstrakt aynen tartıldı ancak modifiyerli ekstraksiyonda elde edilen ekstraktlar bir miktar metanol içerdiği için önce çözücüsü uçuruldu daha sonra tartım yapıp verim hesaplandı. İTK ve HPLC' de saflık kontrolü yapıldı.

2.3.7. Asit Hidrolizi

Tohumlarının içeriğinde kolşisinin yanı sıra 3-demetil kolşisin ve kolşikosid de bulunmaktadır. Kolşikosid, kolşisin molekülüne bir şeker bağlanmasıyla oluşan yapıdır. Asidik ortam hidrolizi ile glikozid yapılar parçalanabilir. Elde edilen ekstrakt içindeki kolşikozidin hidroliz işlemi ile parçalanması yoluyla kolşisin verimleri artırılabilir. Bu amaçla bir hidroliz çalışması tasarlandı. Karışım suda çözülerek pH' ı 2' ye ayarlandı, çözelti sıcakta ve soğukta çalkalandı ve içeriğindeki kolşikosidin parçalanıp parçalanmadığı kontrol edildi.

Daha önceden ekstre edilmiş olan ham karışım iki gruba bölünüp biri yaklaşık 22 C° de soğukta ve diğeri yaklaşık 50 C° de 1 saat boyunca çalkalandı. Çalkalama bittikten sonra suyu evaporatörde uzaklaştırıldı. Tekrar metanolde çözülüp kurutucu eklendi ve çözücü tekrar buharlaştırıldı. Hidroliz sonucu elde edilen ekstraktlar HPLC ile analiz edildi.

2.3.8. HPLC Analizleri

Kantitatif hesaplamalar ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile yapıldı. Analiz için hem UV dedektörü hem de diod array dedektörü (DAD) kullanıldı. Hitachi Elit marka (Japonya) bir HPLC kullanıldı. Bu dedektör istendiği takdirde ayrılan bileşenin 200-400 nm aralığında taramalı spekturunu alma kabiliyetine sahiptir. Sabit faz olarak Kromasil C18 (15,0x4 mm; 5 µm) kolonu kullanıldı. Analiz için hareketli faz olarak asetonitril ve su gradiyent programı kullanıldı (Tablo 6) (Ellington vd., 2003). Çözücü akış hızı 0,800 mL/dk olarak belirlendi. Hareketli faz, içerisindeki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için çözücüler 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi daha sonra analizlerde kullanıldı.

Tablo 6. HPLC gradiyent programı

Zaman (dk)	Asetonitril (%)	Su (%)
0	11	89
1	12	88
12	30	70
16	15	85
18	12	88
20	11	89

HPLC analizi için her biri 1 mg/mL (1000 ppm) derişimli örnekler hazırlandı. HPLC saflıkta metanolde çözüldü, 0,45 µm' lik filtrelerden süzüldü, 20 µL' lik örnek otomatik sampler ile uygulandı ve dedektör dalga boyu 350 nm' ye ayarlandı.

3. BULGULAR

3.1. Yağ Ekstraksiyonu

Bölüm 2.3.2' de detayları verilen yağ ekstraksiyonunda 400 mL petrol eteri ile yapılan 30 dakikalık çalkalama işlemi sonucunda elde edilen veriler Tablo 7' de, 150 mL petrol eteri ile yapılan çalkalama işlemleri sonucu elde edilen veriler ise Tablo 8' de verilmiştir. Tohumda ortalama %8 yağ olduğu belirlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Tablo 7. 400 mL petrol eteri ile yapılan yağ ekstraksiyonu sonucu elde edilen yağ miktarları, yüzdeleri ve ortalaması

Örnek kütlesi (g)	Yağ kütlesi (g)	Yağ %
8,00	0,64	8,01
8,00	0,64	8,05
8,00	0,65	8,10
Ortalama		%8,05

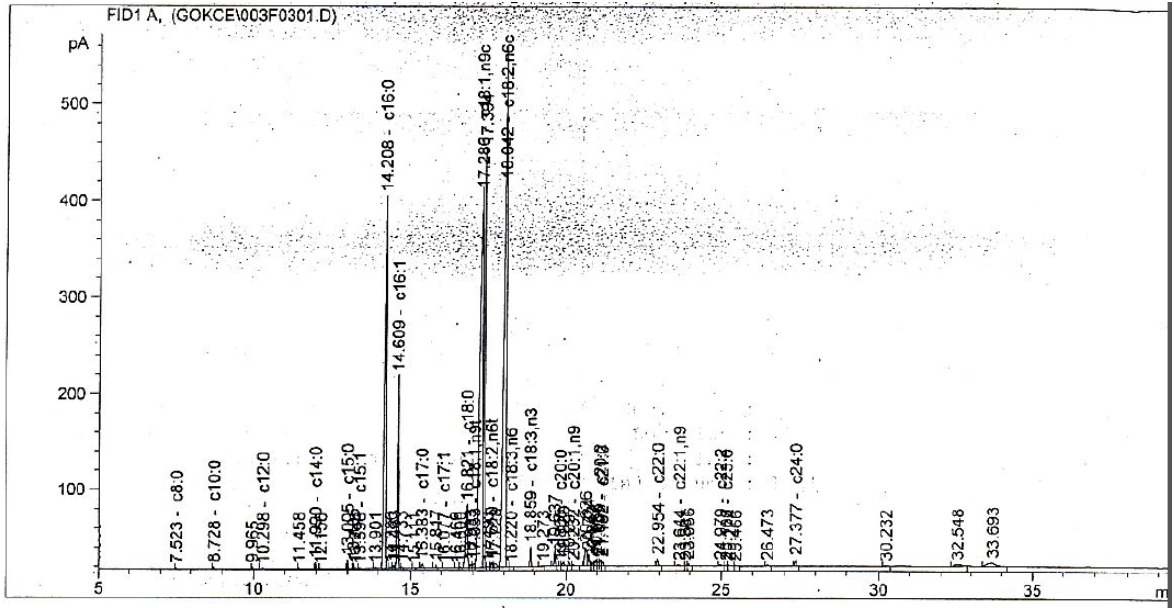
Tablo 8. 150 mL petrol eteri ile yapılan yağ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen yağ miktarı, yağ yüzdesi ve ortalaması

Örnek kütlesi (g)	Yağ kütlesi (g)	Yağ %
8,00	0,64	7,93
8,00	0,63	7,89
8,00	0,63	7,92
Ortalama		%7,92

Tablo 7 ve 8 verilerine göre 8 g öğütülmüş *Colchicum* tohumu yaklaşık olarak %7-8 yağ içermektedir. 400 mL oldukça yüksek bir hacim olduğundan 150 mL petrol eteri ile önemli bir kayıp olmadan (%7,92) aynı yağ verimi elde edilmiştir. Yağı alınan kalıntı petrol eterinden ayrıldıktan sonra kolşisinlerin ekstraksiyonu için kullanıldı.

3.1.1. Yağ Bileşenlerinin GC-FID Analizi

Tohumdan elde edilen yağ, GC-FID (gaz kromatografisi-alev iyonlaştırma dedektörü) ile analiz edildi ve yağ asidi standartları ile bileşenler tanımlandı. Bu analiz sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 12’ de ve elde edilen yağın içeriğinde yüksek oranlarda bulunan yağ asitlerinin alıkonma zamanları ve yüzdeleri Tablo 9’ da verilmiştir.



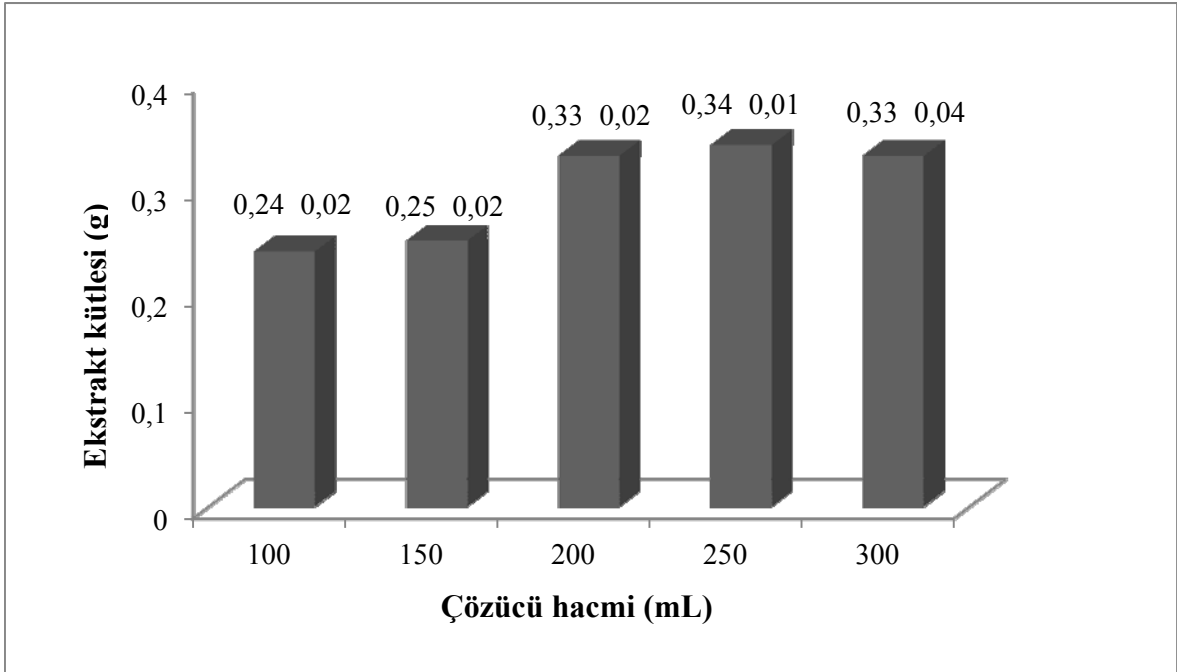
Şekil 12. Yağ ekstraktının GC-FID kromatogramı

Tablo 9. Yağ içeriğinde yüksek oranda bulunan yağ asileri (metil esterleri), alıkonma zamanları ve yağ içindeki yüzdeleri

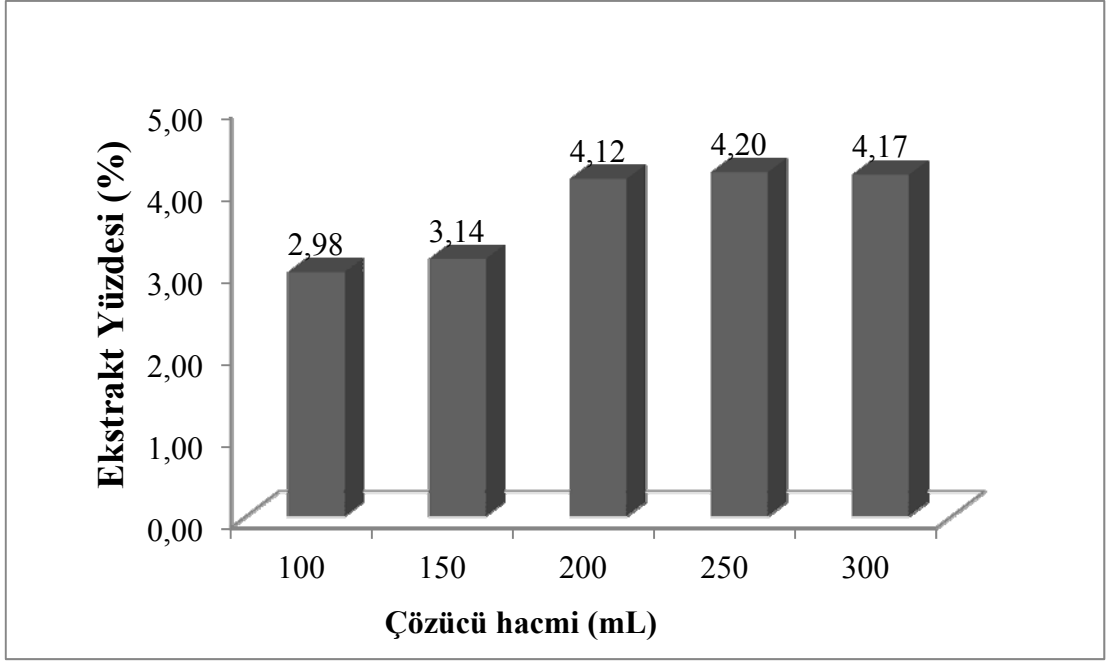
Yağ asidi metil esterleri (M.E.)	Alıkonma süreleri (dk)	Yağ Yüzdesi (%)
Palmitik asit M.E.	14,208	13,69
Palmitoleik asit M.E.	14,609	5,16
Stearik asit M.E.	16,821	2,63
Oleik asit M.E.	17,286	25,87
Linoleik asit M.E.	18,042	28,29

3.2. Çözücü Hacmi Optimizasyonu Çalışmaları

Optimizasyon çalışmasının ilk aşamasında, çözücü oranı ve çalkalama süresi sabit tutulup çözücü hacmi değiştirildi. Bu bağlamda, 95:5 metanol-su oranında 100, 150, 200, 250, 300 mL hacimlerde 1 günlük çalkalama işlemi yapıldı. Çalkalanma süreci içerisinde iki kez 30 dakika ultrasonik ekstraksiyon işlemi yapıldı ve çalışmalar üç kez tekrar edildi. Elde edilen ham karışımın kütleleri ve % ekstrakt verimleri Şekil 13 ve 14' de verilmiştir.



Şekil 13. Yapılan hacim belirleme ekstraksiyonları sonucu elde edilen ortalama ham karışım miktarları ve standart sapmaları

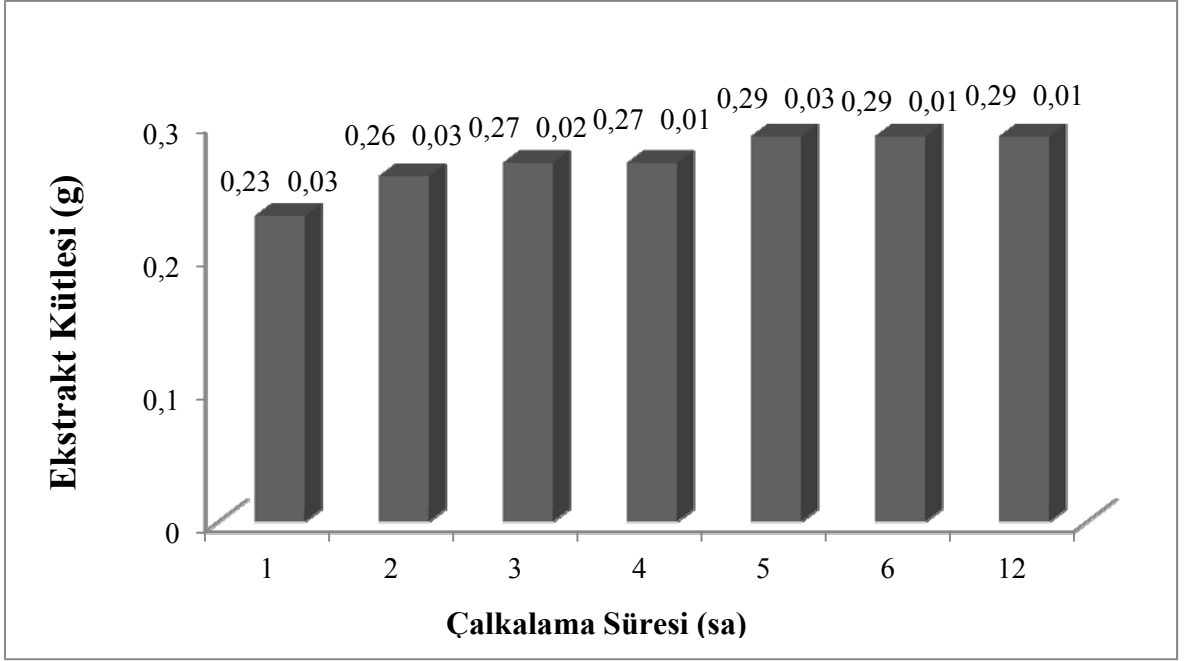


Şekil 14. Yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen ham karışım yüzdeleri

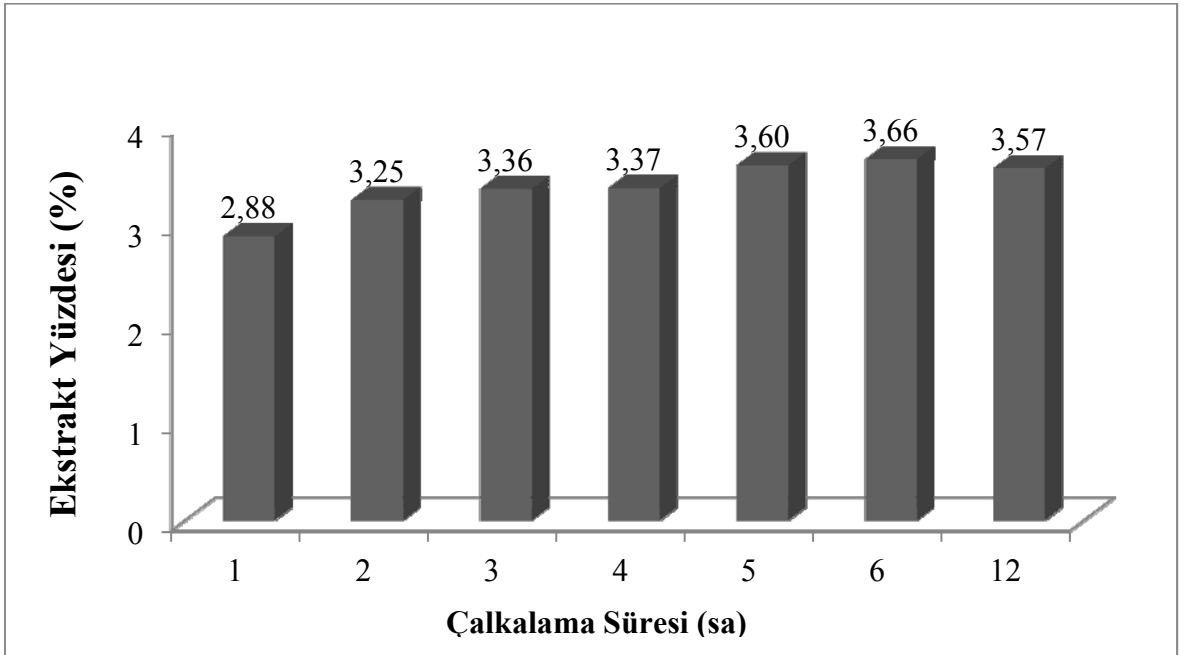
Şekil 13 ve 14 verileri göz önüne alındığında, çözücü hacmini 100 mL' den 300 mL' ye arttırmanın ekstrakt verimlerini önemli derecede arttırdığı söylenebilir. Ancak 200, 250 ve 300 mL' lik hacimlerde hemen hemen aynı ekstrakt verimleri elde edildiğinden, çözücü sarfiyatından kaçınmak için en uygun çözücü hacmi 200 mL 95:5 Metanol su olarak belirlendi.

3.3. Çalkalama Süresi Optimizasyonu Çalışmaları

Bölüm 3.2' de elde edilen çözücü hacmi kullanılarak çalkalama süresi optimizasyonu gerçekleştirildi. 200 mL 95:5 metanol su oranında 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 12 saatlik çalkalama işlemleri yapıldı. Bu çalkalama süreçlerinde 30 dakika ultrasonik ekstraksiyonu da yapıldı. Elde edilen veriler Şekil 15 ve Şekil 16' da verilmiştir.



Şekil 15. Yapılan süre belirleme ekstraksiyonları sonucu elde edilen ortalama ham karışım miktarları ve standart sapmaları

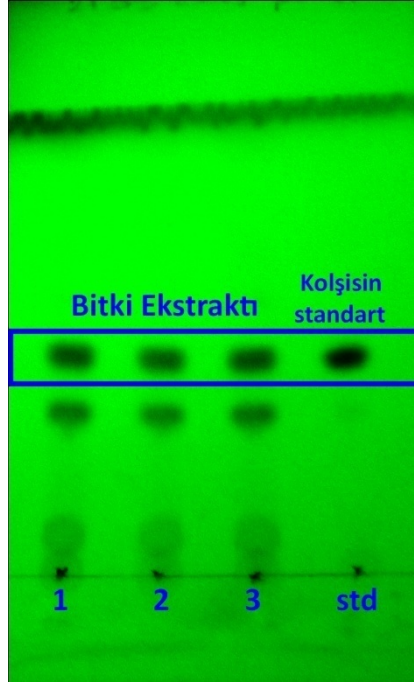


Şekil 16. Yapılan süre belirleme ekstraksiyonları sonucu elde edilen ham karışım yüzdeleri

Çalkalama süresinin kısılması ekonomik anlamda etkin bir ekstraksiyon için önemlidir. 24 saatlik süreçle çalkalama için harcanacak enerji ve zaman göz önüne alındığında, bu süreci daha kısa bir sürece çekmek üretimde maliyeti düşürecektir. Şekil 15 ve Şekil 16’ da görüleceği gibi 1 saatlik çalkalamada %2,88 oranında ekstrakt elde edilmektedir. 24 saatlik süreçte bu oran %4,12’ dir ve gerekli enerji hesaplamaları hangisinin daha kazançlı olacağını verebilir. Verim açısından değerlendirildiğinde 5 saatlik çalkalama süresi ile 6 ve 12 saatlik çalkalama süresi arasında çok anlamlı farklar görülmemektedir. Bu nedenle 5 saatlik çalkalamanın 24 saatlik çalkalamadan çok da düşük olmayan ekstrakt verimleri sağladığı söylenebilir.

3.4. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Her bir çalışma sonucunda ekstraksiyonun yapıp yapılamadığını gözlemlemek için İTK yöntemi kullanıldı. İTK için silika 64 F₂₅₄ floresans tabakalar kullanıldı. Bu tabakaların üzerine belli bir miktar örnek yüklenerek 100:13,5:10 oranlarındaki etil asetat-metanol-su karışımından oluşan yürütme çözücüsünde yürütüldü ve 254 nm UV ışık altında kontrol edildi. Sıvı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen kolşisin ekstraktlarının İTK ile elde edilen kromatogramı Şekil 17’ de görülmektedir. Şekilden de görüleceği gibi hareketli fazda en hızlı yürüyen kolşisin olup standart ile aynı R_f değerlerinde gözlemlenmiştir. Kolşisinin hemen ardında ekstrakt içinde belirgin olarak ikinci bir bileşenin ayrıldığı, örnek uygulama noktasının hemen üzerinde ise üçüncü bir bileşen grubu da belirlenmiştir. Literatür kaynaklarına dayanarak bu bileşenlerin 3-demetil kolşisin ve kolşikosid olduğu düşünülmüş ancak standartlar mevcut olmadığından tam konfirmasyonları yapılamamıştır.



Şekil 17. Ham ekstraktın İTK görüntüsü

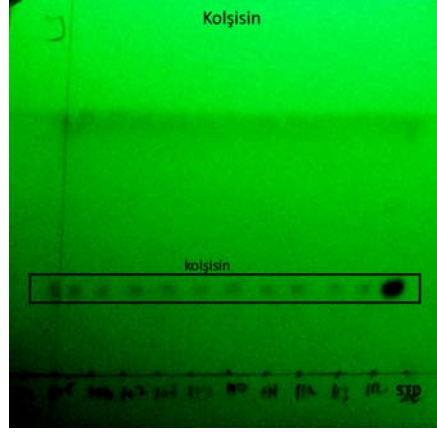
3.5. Kolon Kromatografisi

İTK ile belirlenen bileşenlerin birbirinden ayrılması için kolon kromatografisi çalışmaları yapıldı. Kolonda fraksiyonlama işlemi sonrası elde edilen ve saf bileşenler olduğu düşünülen fraksiyonlar birleştirilip HPLC analizleri yapıldı. HPLC analizlerinde bölüm 2.3.8’ de verilen şartlar kullanıldı. Silika jel kolon dolgu maddesi ile yapılan fraksiyonlamalarda üç farklı elüent kullanıldığından İTK ve HPLC analizleri de bu sıra ile değerlendirilmiştir.

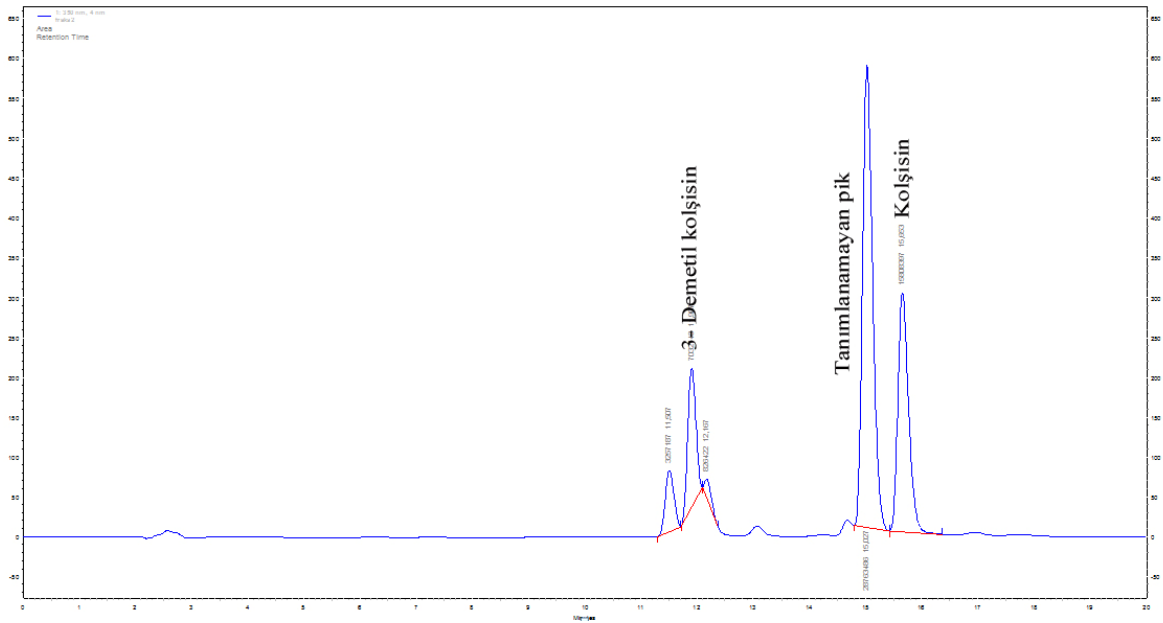
Silika jel-1

İTK analizlerine ait tabakaların görüntüsü Şekil 18, 20 ve 22’ de verilmiştir. İTK’ de kolşisinin saflaştırıldığını düşündüren görünüm olmasına rağmen (Şekil 18) HPLC’ de saflaştırmanın tam olarak yapılmadığı belirlendi (Şekil 19). Bir miktar 3-demetil kolşisin ve tohumlardan gelen çeşitli maddelerin dışında (11-12. dakikalar arası) kolşisin pikinin hemen solunda bir başka pik olduğu da gözlemlendi. 3-demetil kolşisin (Şekil 20 ve 21) ve kolşikosidin (Şekil 22) ve (Şekil 23) saflaştırılması tam olarak gerçekleştirildi. Bu çalışma

sonucunda %0,55 kolşisin içeren fraksiyon, %0,22 3-demetil kolşisin ve %0,87 kolşisin içeren fraksiyonlar elde edildi.



Şekil 18. Kolondan saflaştırılan kolşisin'in İTK görüntüsü

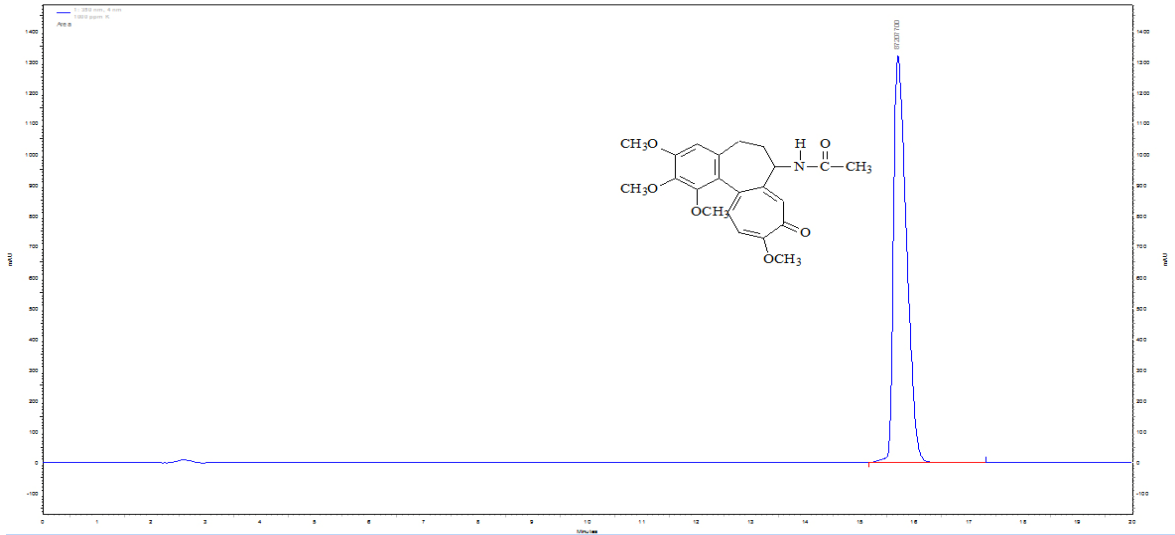


Şekil 19. Kolondan elde edilen kolşisin fraksiyonunun HPLC kromatogramı

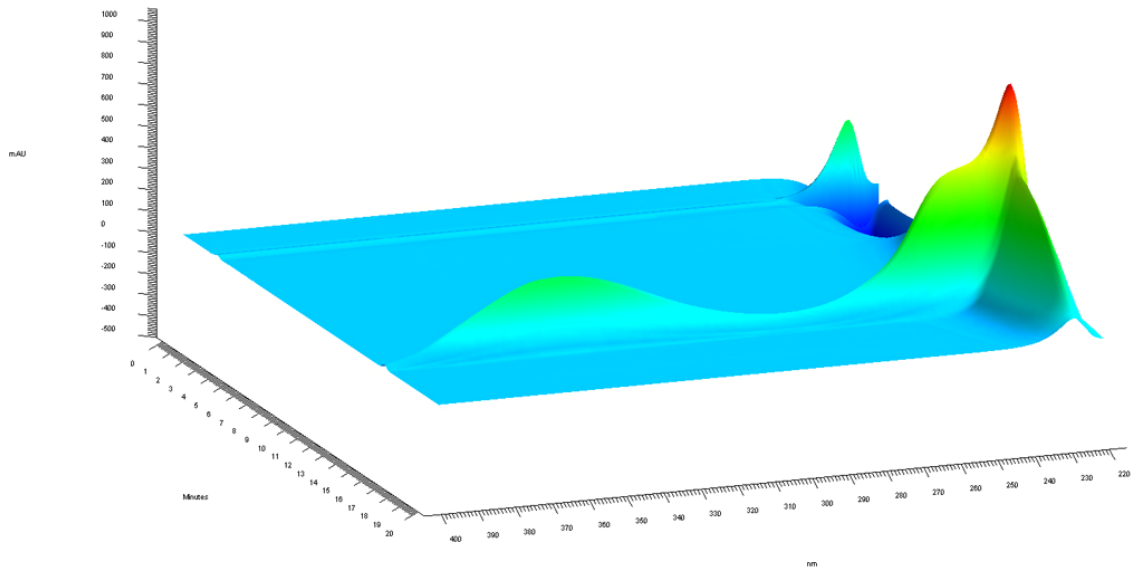
İTK' da tek bir spot olarak görünen ve saf bir bileşen olduğu düşünülen fraksiyonun HPLC analizi tek bileşen olmadığı ve benzer özellikte ikinci bir bileşeni de içerdiği belirlenmiştir. HPLC analizinin yapıldığı cihazın, ayrılan bileşenlerin taramalı UV spektrumlarını alabilen Diyod Array Dedektörü (DAD) bulunduğu için, bu piklerin

tanımlanması için saf kolşisin spektrumu (T_R ile) ve DAD spektrumuyla (ayrılan bileşenin 200-400 nm aralığında UV-GB absorpsiyon taraması) karşılaştırma yapıldı.

Ticari tabletlerden elde edilen saf kolşisin standartı (1 mg/mL) kullanılarak yapılan HPLC analizine ait kromatogram Şekil 20’ de ve bu bileşenin DAD spektrumu Şekil 21’ de verilmiştir.

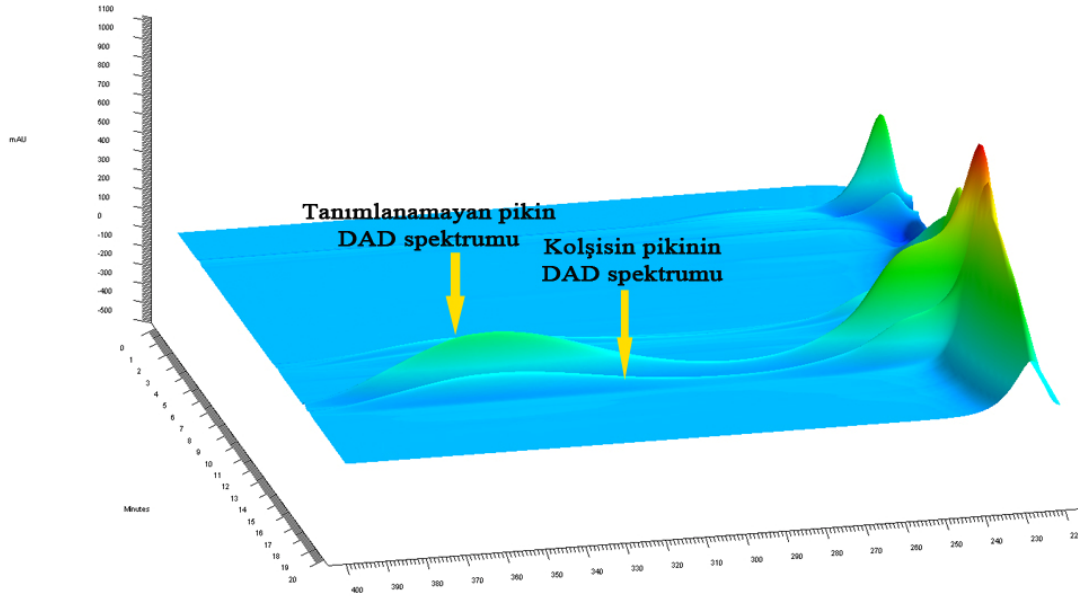


Şekil 20. Saf kolşisin HPLC kromatogramı



Şekil 21. Saf kolşisin DAD spektrumu

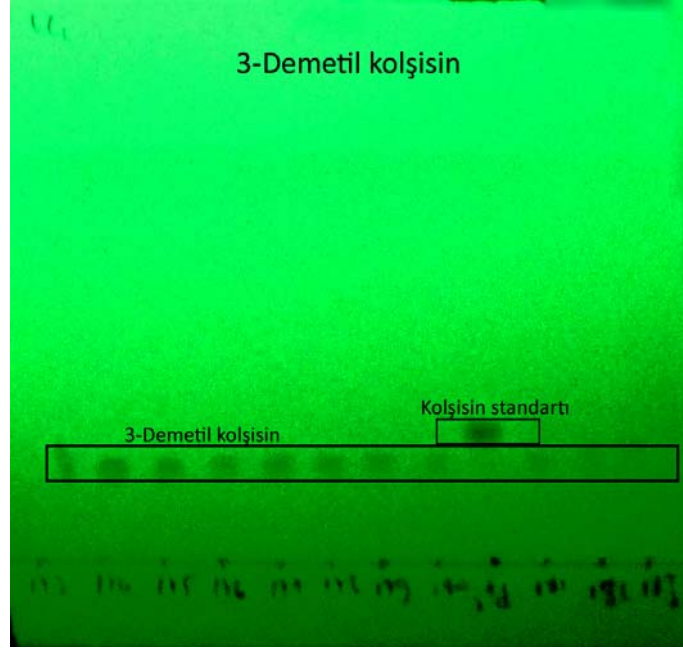
Şekil 19’ da verilen fraksiyonun HPLC analizinde 15,027 ve 15,653 dakikalarında çıkan bileşenlerin alıkonma süreleri ve DAD spektrumları karşılaştırılarak tanımlanamayan pikin ne olduğu ile ilgili bazı bilgiler elde edilebilir. Şekil 22’ de bu iki bileşene ait DAD spektrumları verilmiştir.



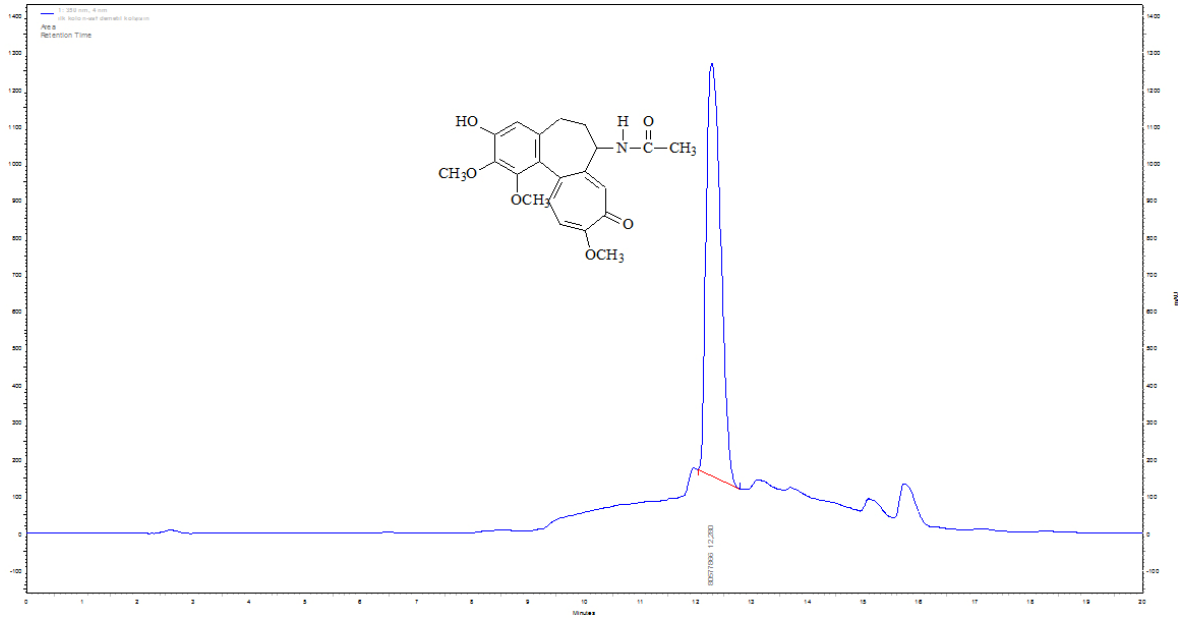
Şekil 22. Tanımlanamayan ancak kolşisin fraksiyonu ile izole edilen bileşenin ve kolşisinin DAD kromatogramları

DAD spektrumları karşılaştırıldığında her iki bileşenin de aynı absorpsiyon spektrumunu verdiğini ve muhtemelen aynı kimyasal yapıya sahip olduğunu söylenebilir. İTK’ da aynı fraksiyonda olmaları da bunun bir kanıtı olabilir. Bu nedenle 15,027. dakikada gelen bu bileşenin kolşisin ile aynı yapıda ancak büyük olasılıkla kolşisinin R, S izomerik yapılarından biri olduğu söylenebilir. Bu olasılığın doğrulanması için bu iki bileşeni içeren örneğin LC-MS (sıvı kromatografisi kütle spektrometresi) analizlerinin yapılması gerekir. Bu çalışmalar hala devam etmektedir.

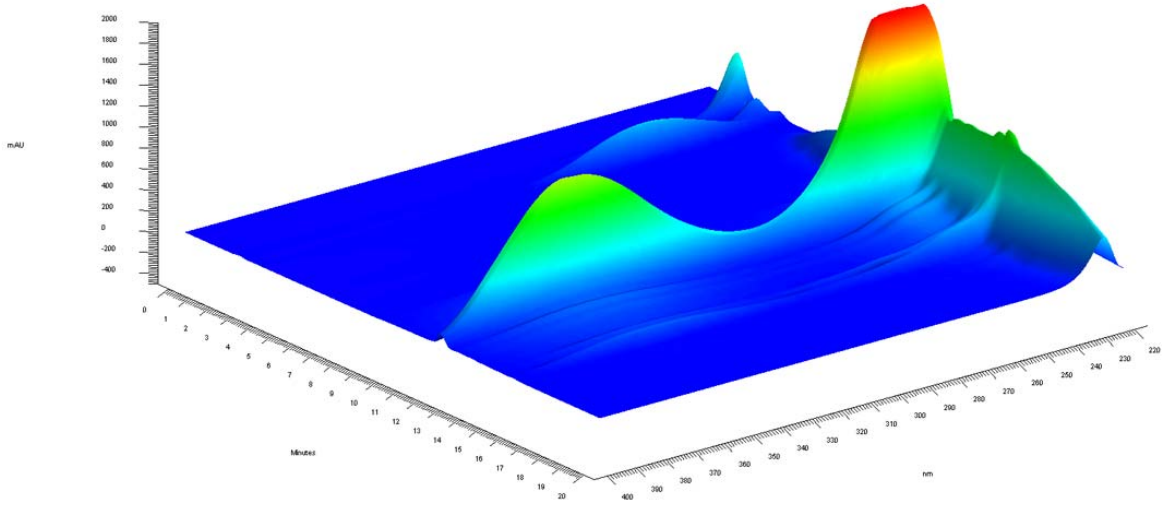
Kolon kromatografisi ile ayrılan ikinci bileşen olan 3-demetil kolşisinin İTK ve HPLC kromatogramları Şekil 23 ve 24’ de ayrılan bileşenin DAD spektrumu da Şekil 25’ te verilmiştir.



Şekil 23. 3-demetil kolşisinin İTK görüntüsü



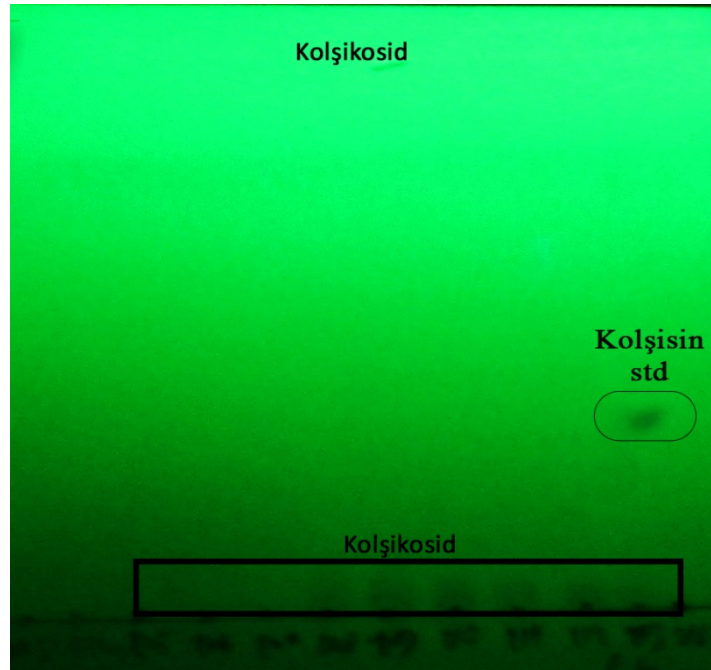
Şekil 24. 3-demetil kolşisin HPLC kromatogramı



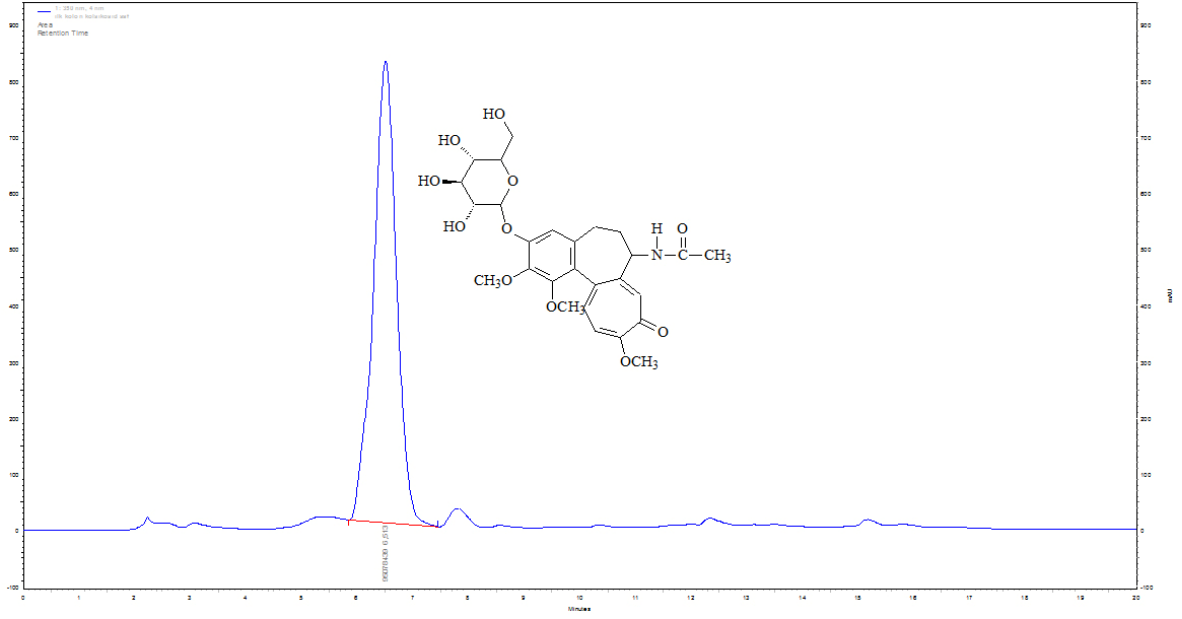
Şekil 25. 3-demetil kolşisinin DAD spektrumu

Verilerden de görüleceği gibi 3-demetil kolşisin başarılı bir şekilde izole edilmiştir.

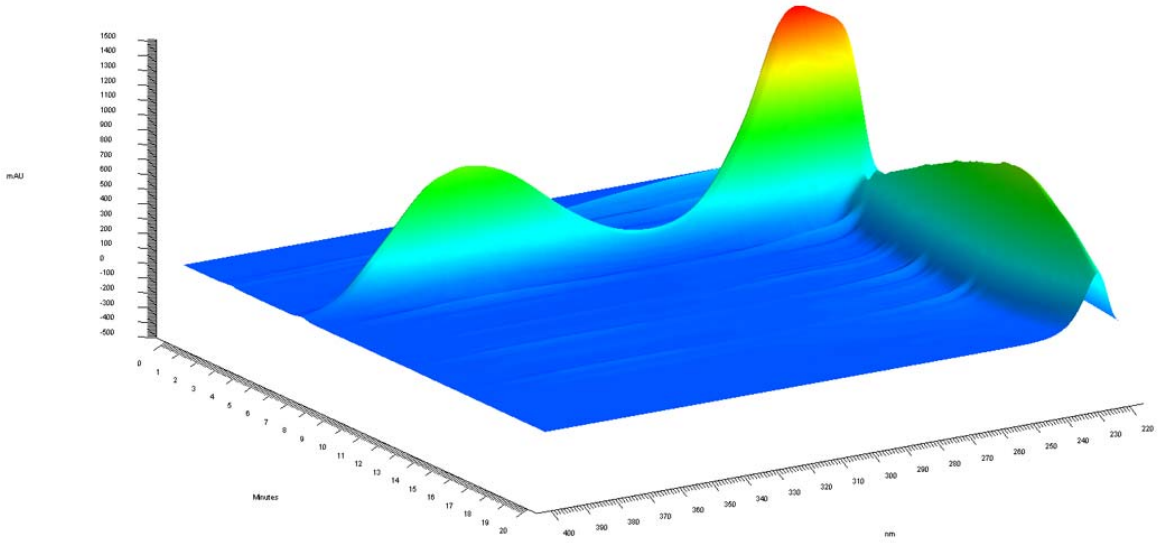
İzolasyonda kolşikosid fraksiyonu olarak ayrılan bileşiğin İTK ve HPLC kromatogramları Şekil 26, 27 ve 28' de verilmiştir.



Şekil. 26. Kolondan elde edilen kolşikosidin İTK görüntüsü



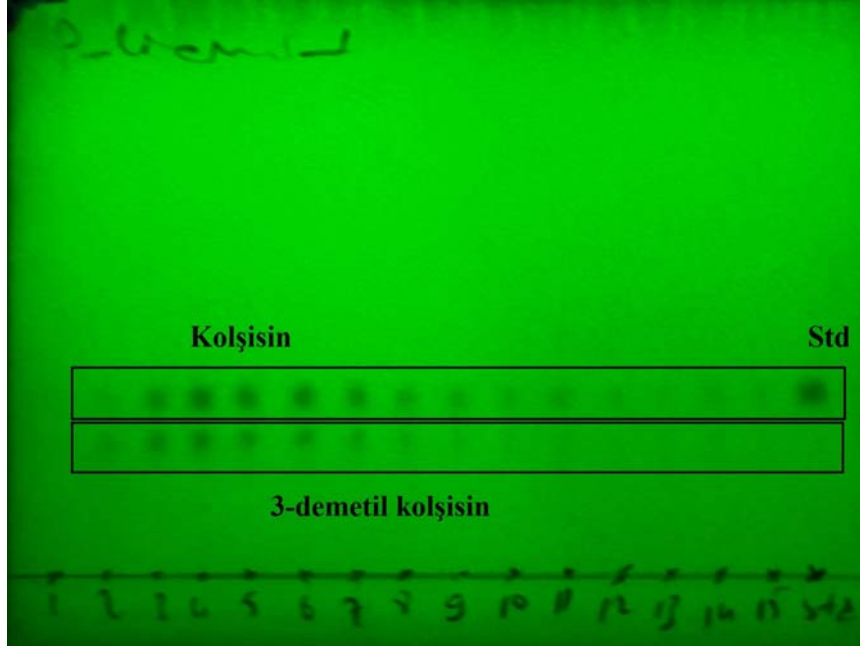
Şekil 27. Kolondan elde edilen kolşikosidin HPLC kromatogramı



Şekil 28. Kolondan elde edilen kolşikosidin DAD spektrumu

Uygulanan kolon sistemi (silika jel-1) ile ekstre edilen bileşenler başarılı bir şekilde ayrılabilmişlerdir.

Silika jel kolon dolgu maddesi yerine poliamid ve selüloz kolon dolgu maddeleri kullanılarak aynı hareketli faz sistemi ile (silika jel-1' de kullanılan) bir seri ayırma işlemi çalışıldı. Poliamid kolon dolgu maddesi ile etkin bir ayırma sağlanamadı. Kolşisin ve 3-demetil kolşisin kolonun henüz başında kolondan birlikte ayrıldı (Şekil 29).

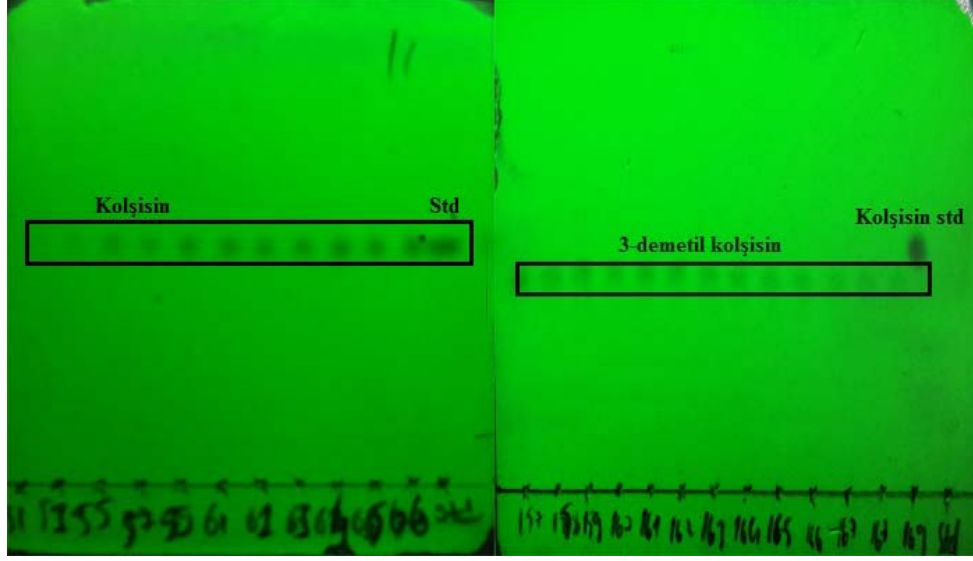


Şekil 29. Poliamid ile yapılan kolonun İTK görüntüsü

Selüloz kullanılarak yapılan ayırma çalışmasında ise akış hızının çok düşük olması nedeniyle ayırma işlemi çok uzun süreçlere yayılacağından bu sistemin de uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Silika jel-2

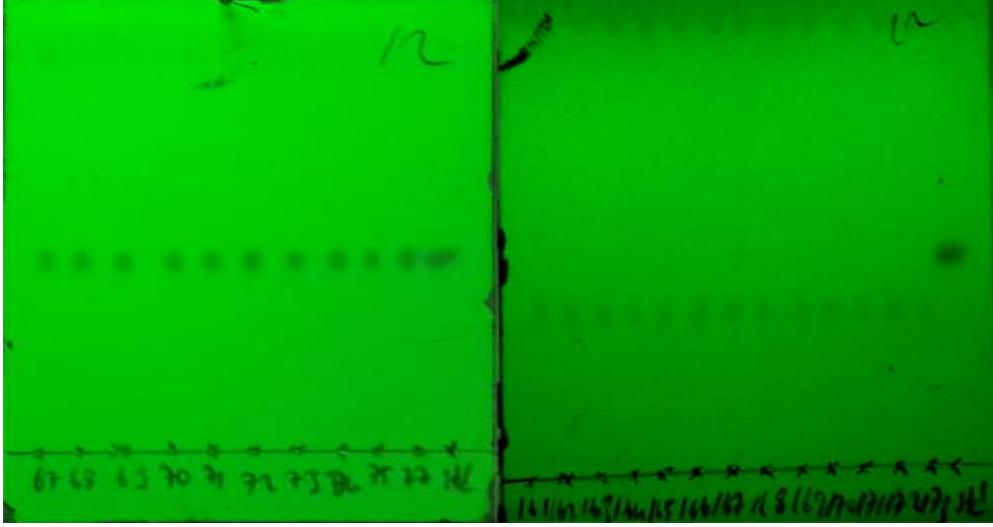
Bu ayırma sistemi özellikle kolondan birlikte ayrılan kolşisin ve izomeri olduğunu düşündüğümüz ikincil bileşeni birbirinden ayırabilmek için tasarlanmıştır. Bu sistem ile elde edilen fraksiyonlarda da Şekil 30' da verilen fraksiyonlar elde edilmiştir. Ancak HPLC analizinde Şekil 19' a benzer bir kromatogram elde edildi. Kullanılan bu hareketli faz ile de kolşisin izomerleri birbirinden ayrılamadı.



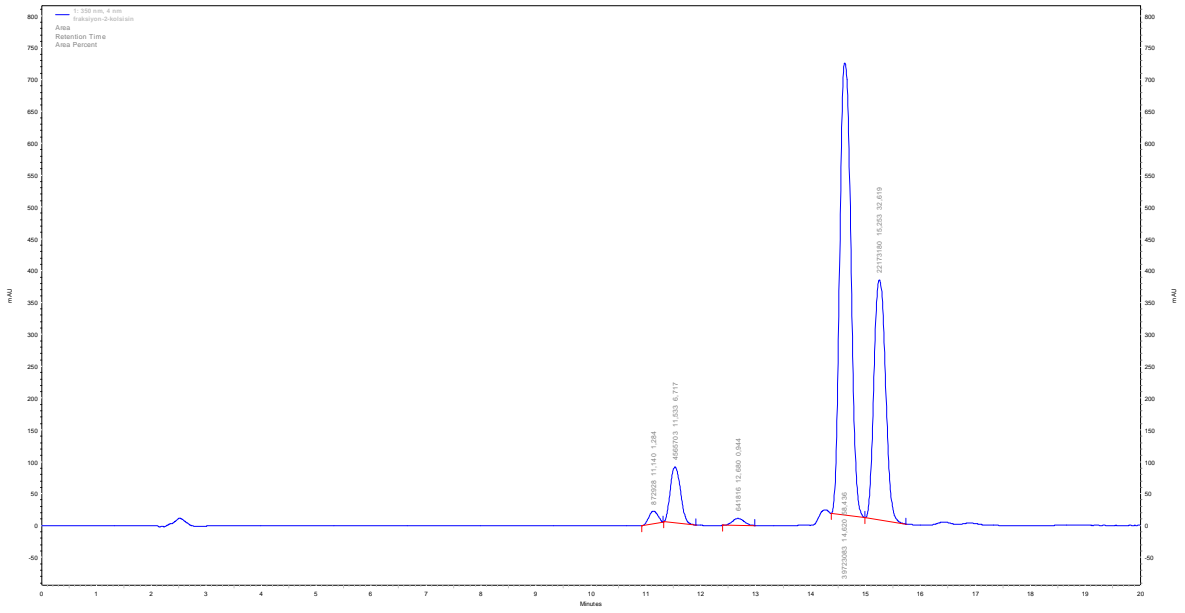
Şekil 30. Kolondan ayrılan kolşisin (solda) ve 3-demetil kolşisinin (sağda) İTK görüntüsü

Silika jel 3

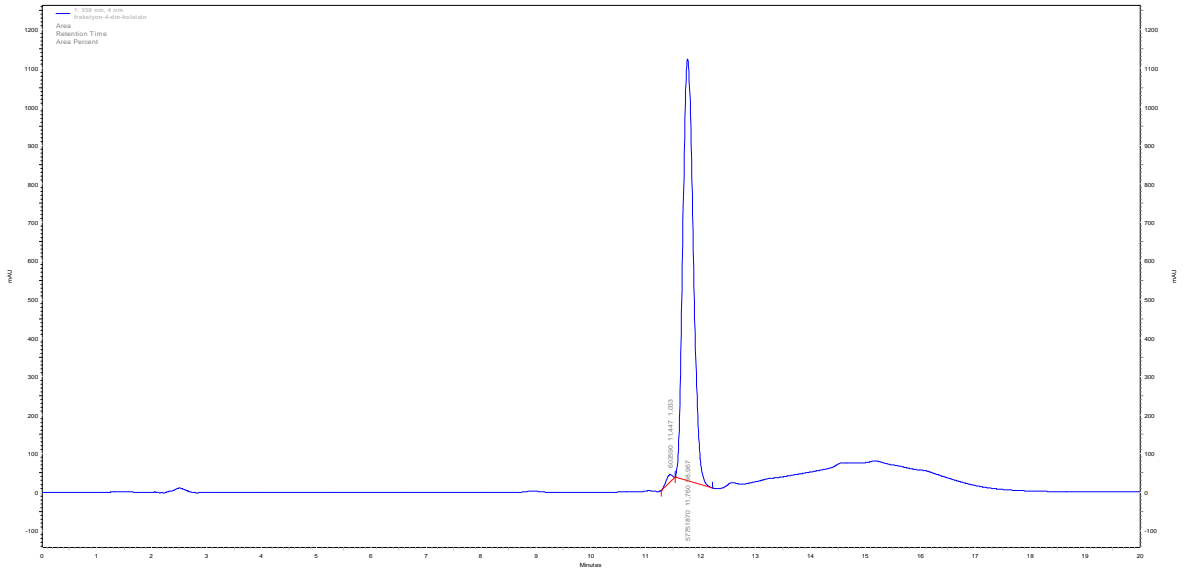
Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı hekzan ilavesiyle polarite indeksi 1' e düşürülen hareketli faz ile ayırma yapıldı. Kolondan ilk olarak kolşisin ayrıldı ve fraksiyonlar İTK (Şekil 31) ve HPLC' de (Şekil 32) kontrol edildi. İTK' de saf olarak elde edildiği gözlemlenmesine rağmen HPLC' de tanımlanamayan pikin ve bir miktar 3-demetil kolşisin gözlemlendi. 3-demetil kolşisin saf olarak elde edildi (Şekil 31 ve 33). Düşürülen hareketli faz polaritesi kolşisinlerin daha saf olarak ayrıldığını göstermektedir. Şekil 31' de 11-13. Dakikalar arası gözlenen 3-demetil kolşisin ve diğer kalıntıların bu fraksiyonda oldukça azaldığı gözlemlendi. Ancak kolşisin ve izomeri olduğu düşünülen bileşiğin ayrılması sağlanamamıştır. Bu durum gözlemlendikten sonra kolona devam edilmedi. Bu işlemler sonucunda %1,29 kolşisin içeren fraksiyon ve %0,40 3-demetil kolşisin içeren fraksiyon elde edildi.



Şekil 31. İzole edilen kolşisin (solda) ve 3-demetil kolşisinin (sağda) İTK görüntüleri



Şekil 32. Kolondan izole edilen kolşisin fraksiyonunun HPLC kromatogramı



Şekil 33. Kolondan izole edilen 3-demetil kolşisinin HPLC kromatogramı

3.6. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

SFE işleminde ön denemelerde yağı alınmamış tohumlar kullanıldı. Ancak apolar bir bileşik olan CO₂ tohumların içerisinde bulunan apolar karakterli yağı da çözdüğünden elde edilen ekstraktlar yağimsi bir yapıdaydı. Bu yüzden sonraki çalışmalarda önce tohumların yağı petrol eteriyle alındı daha sonra SFE işlemi yapıldı. Ancak hesaplamalar yağlı tohum üzerinden yapıldığı için, tohumda bulunan %8' lik yağ miktarı 10 g' lık numunelere eklendi ve bu şekilde hesaplamalar yapıldı.

Bu çalışmada ilk olarak doğrudan öğütülmüş tohumların kullanılmasıyla modifiyersiz sistemde süperkritik CO₂ ile 1, 3 ve 5 saatlik ekstraksiyonlar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 10' da verildi.

Tablo 10. Modifiyersiz ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt miktarları, yüzdeleri ve ortalaması

Ekstraksiyon süresi (sa)	Kullanılan tohum kütlesi (g)	Elde edilen ekstrakt kütlesi (g)	Ekstrakt (%)
1	10,8	0,15	1,35
3	10,8	0,13	1,22
5	10,8	0,14	1,29
Ortalama			1,29

Modifiyersiz işlemden ekstrakt miktarı zamandan bağımsız olarak sabit kaldı ve çok düşüktü. Zira bu ekstraktın HPLC analizinde çok az miktarda kolşisin olduğu gözlemlendi.

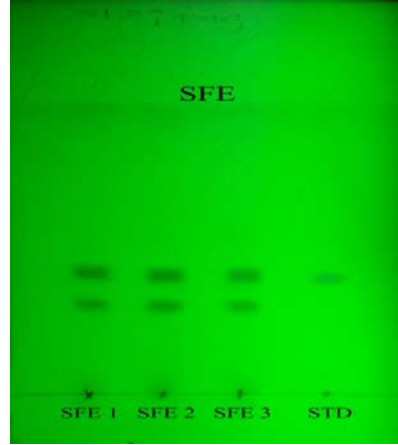
Daha sonra modifiyerli ekstraksiyon işlemleri yapıldı. Modifiyer olarak metanol kullanıldı ve 0,06, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 mL/dk'lık miktarlarda 5 saatlik ekstraksiyonlar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 11' de verildi.

Tablo 11. Modifiyerli ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt miktarları ve yüzdeleri

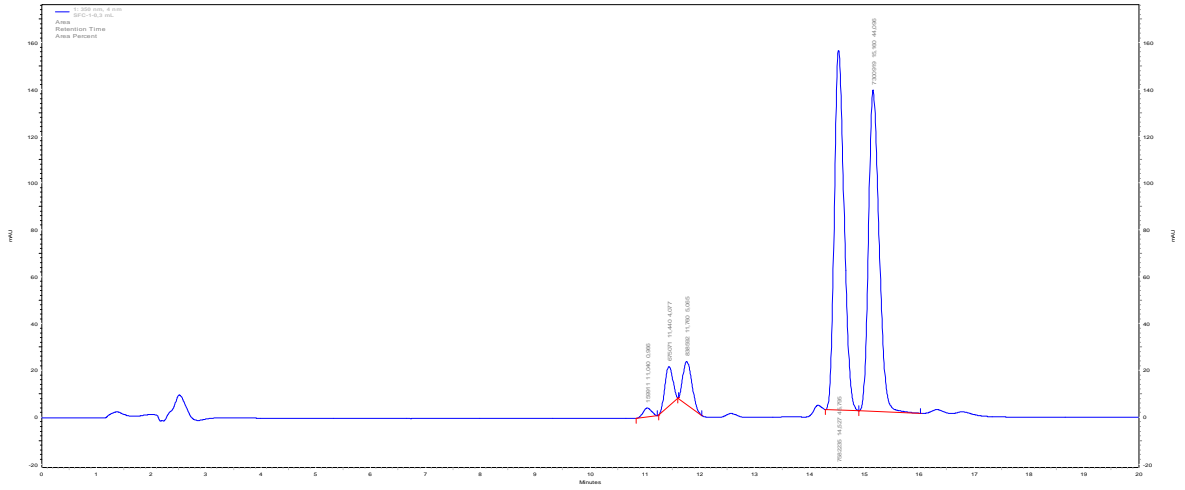
Modifiyer hacmi (mL/dk)	Kullanılan tohum kütlesi (g)	Elde edilen Ekstrakt kütlesi (g)	Ekstrakt (%)
0,06	10,8	0,06	0,60
0,2	10,8	0,06	0,51
0,3	10,8	0,07	0,61
0,4	10,8	0,08	0,90
0,5	10,8	0,16	1,44
0,6	10,8	0,09	0,81

Süperkritik CO₂ içinde modifiyer (polariteyi artırıcı) MeOH miktarı arttıkça toplama kabında toplanan kolşisin ekstraktının arttığı da gözlemlenmiştir. Ekstrakt verimi sıvı ekstraksiyonuna göre oldukça düşük olmasına rağmen kolşisin içeriği bakımından oldukça zengindir.

Ayrıca elde edilen ekstraktlar İTK' de kontrol edildi (Şekil 34). Süperkritik CO₂ ile yapılan ekstraksiyonlar sonucu kolşikosidin ekstrakta geçmediği yapılan HPLC analiziyle belirlendi. Zira kromatogramda kolşikosid piki gözlemlenmedi (Şekil 35). Kolşikosid tamamen kuru tohumun içinde kaldı. Bu ekstraksiyonlar sonucu kolşisinin tamamı ekstrakta alınamadı. Her ekstraksiyon sonucu bir miktar kolşisinin tohumun içersinde kaldığı gözlemlendi. Bunu kanıtlamak için SFE ekstraksiyonu bittikten sonra ekstre edilmiş tohum alındı, metanol ile tekrar çalkalandı ve HPLC de analiz edildi. Bir miktar kolşisinin tohumun içersinde kaldığı gözlemlendi (Şekil 36). SFE ekstraksiyonunda kullanılan modifiyer ile seçimli olarak kolşisin, tanımlanamayan madde ve az miktarda 3-demetil kolşisin elde edildi.



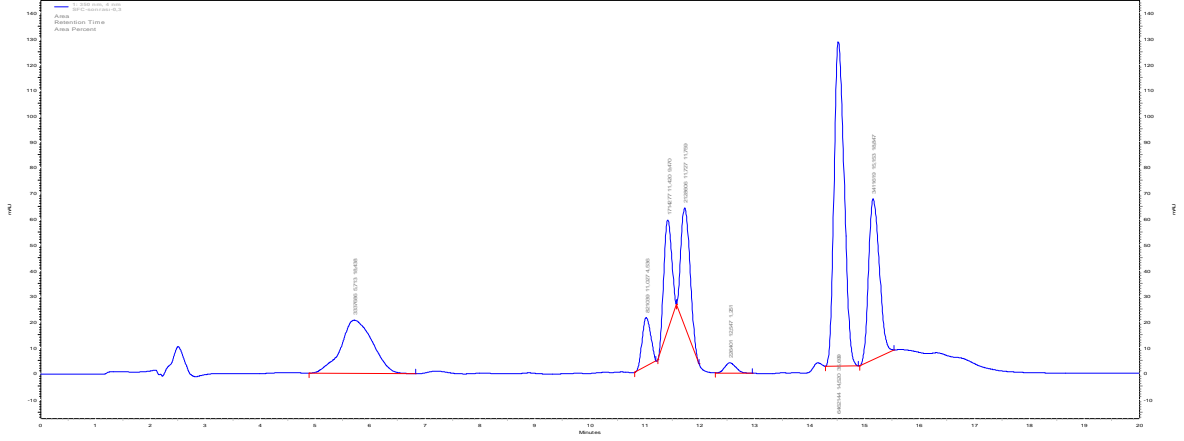
Şekil 34. SFE ekstraktlarının İTK görüntüleri



Şekil 35. SFE' den alınan ekstraktın HPLC kromatogramı (0,06, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 mL/dk modifiyer)

Süperkritik CO₂ ekstraksiyonunu oldukça etkin ve seçici olarak kolşisini (izomeriyle birlikte) ayırabildiği açıktır. SFE kabının içinden 1,5 mL/dk'lık akış hızıyla geçirilen CO₂' e 0,5 mL/dk akış hızlı metanol ilavesiyle ekstrakt verimini %1,44' e çıkartmıştır. Kalıntı materyalin metanol ekstraktında yapılan analiz sonucunda (Şekil 36) kolşisin pikinin küçülmesi 3-demetil kolşisin ve kolşikosid piklerinin büyümesi de bunun kanıtıdır. Bu çalışmada dikkat edilmesi gereken diğer önemli bir bulgu da SFE sisteminin sıvı ekstraksiyonuna göre daha yüksek oranda kolşisini ayırmasıdır. Kolşisinin izomeri olduğu düşünülen pik büyüklüğü daha önceki sıvı ekstraksiyonlarda hep kolşisinden büyük iken (Şekil 32), SFE ekstraktında kolşisin piki ile hemen hemen aynı boyda olduğu

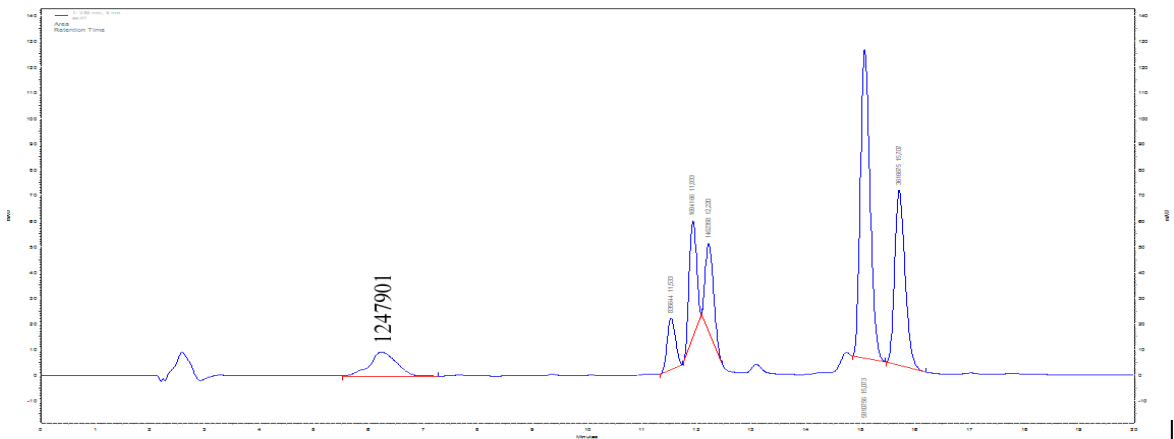
gözlemlenmiştir (Şekil 35). Dolayısıyla SFE' nin kolşisini izolasyonu için çok daha iyi bir yöntem olduğu söylenebilir.



Şekil 36. SFE ekstraksiyonu sonunda kalan tohumun metanol ile çalkalanması sonucu elde edilen kromatogram

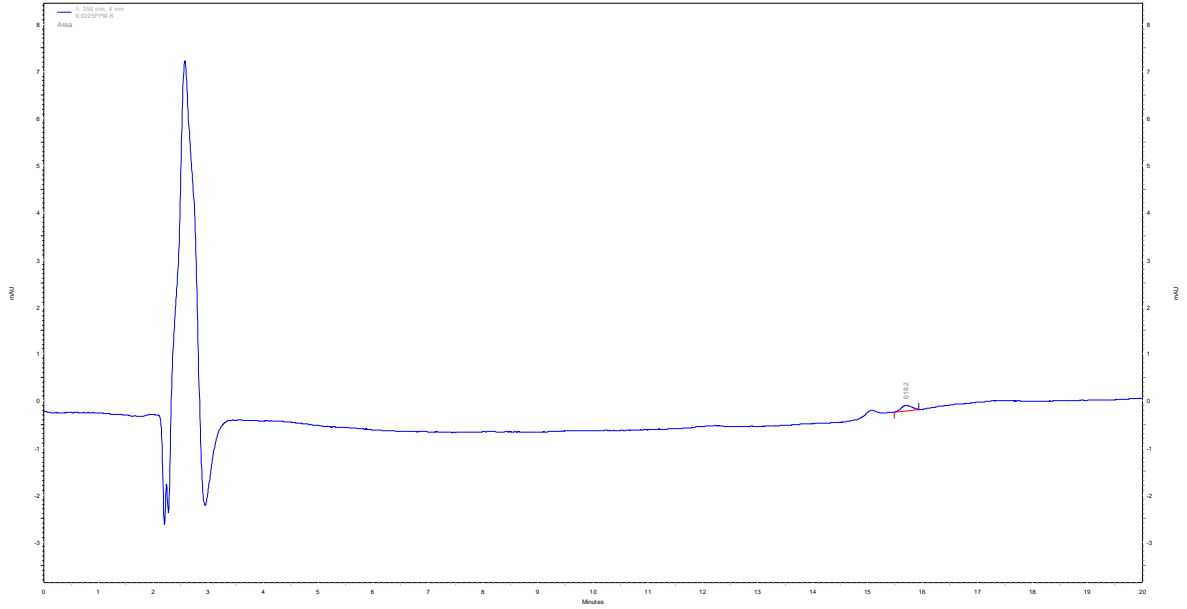
3.7. Asit Hidrolizi

Soğukta ve sıcakta yapılan asit hidrolizi ile kolşikosidin tamamen parçalanmadığı ancak hidroliz sonrası alınan HPLC kromatogramında kolşikosid pikinin alanı azaldığı gözlemlenmiştir. Asitli ortamda çalkalama süresi uzatılırsa kolşikosidin daha fazla parçalanabileceği söylenebilir. Soğukta ve sıcakta çalkalanan ekstraktların kolşikosid alanlarını içerdiği HPLC kromatogramları Şekil 37 ve 38' de, 3 adet ham ekstraktın kolşikosid alanlarını gösteren HPLC kromatogramı da Şekil 39' de verilmiştir.

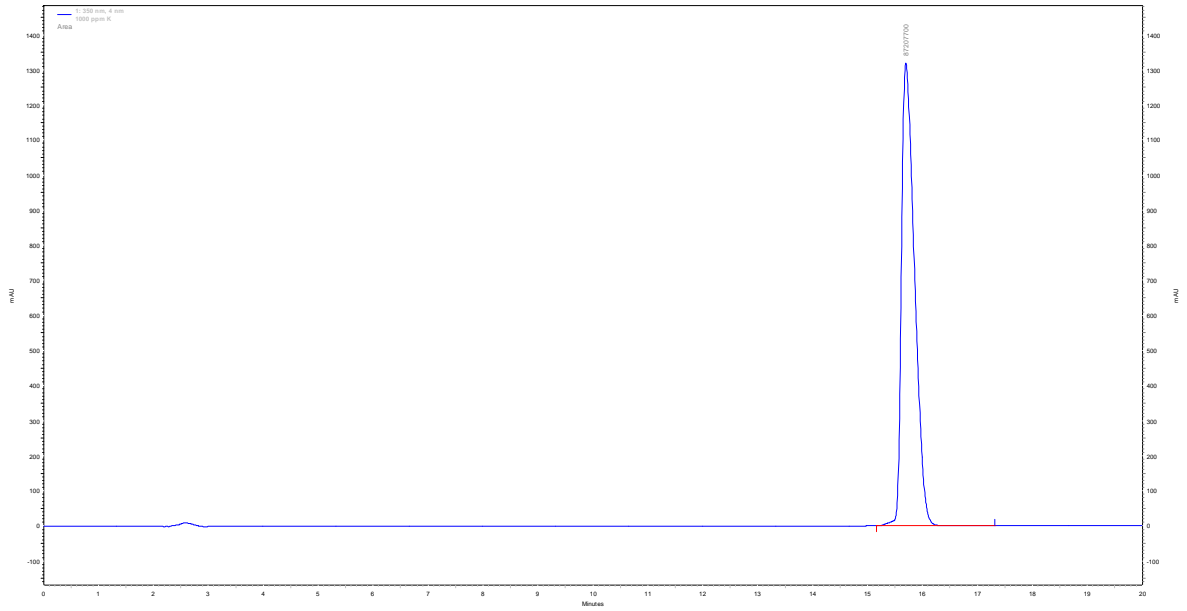


Şekil 37. Soğukta yapılan asit hidrolizinin HPLC kromatogramı ve kolşikosid pik alanı

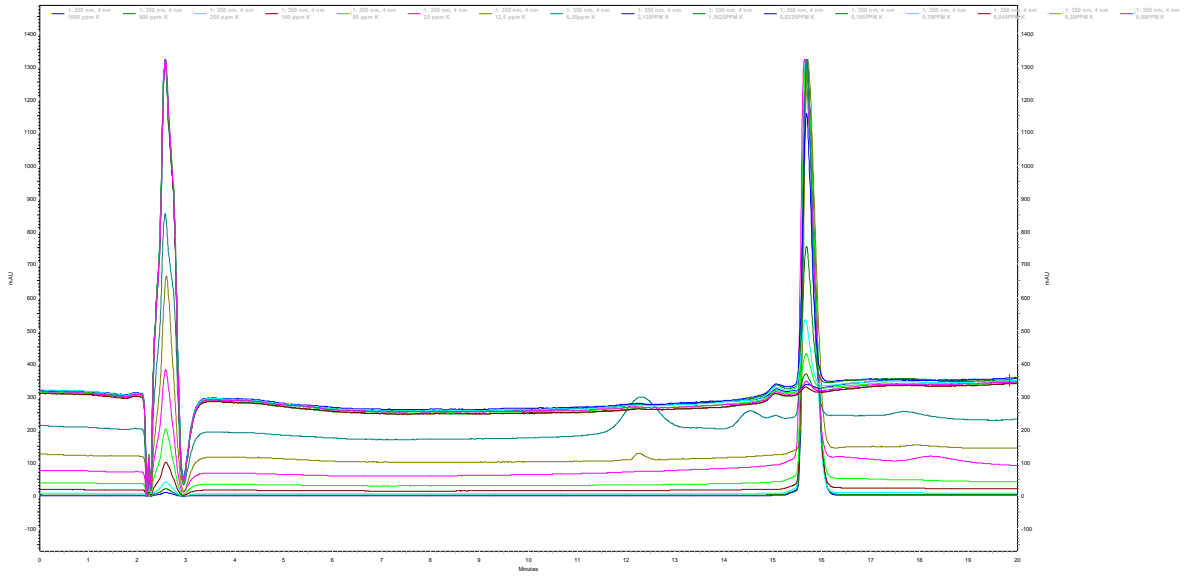
Bu piklerin alanları Tablo 12' de, alanlardan çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 43' de verilmiştir.



Şekil 40. 0,0225 ppm derişim de gözlenen kolşisin piki



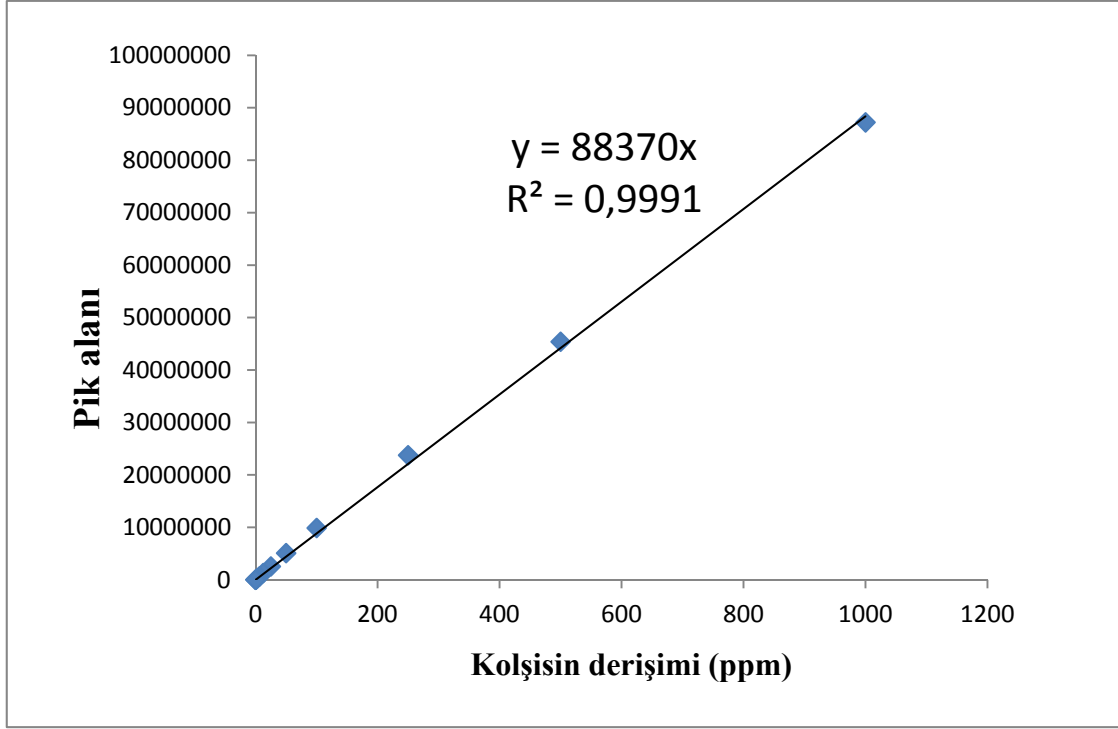
Şekil 41. 1000 ppm derişimde gözlenen kolşisin piki



Şekil 42. 0,0225 ppm ve 1000 ppm arasındaki derişimlerde elde edilen kolşisin pikleri

Tablo 12. Hazırlanan standart derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen alanlar

Standart (ppm)	Standart (ppm)
1000	87207700
500	45385346
250	23742741
100	9879128
50	5084733
25	2548794
12,5	1294327
6,25	640268
3,125	323524
1,5625	162671
0,78	81071
0,39	42735
0,195	24104
0,09	12694
0,045	8129
0,0225	6182



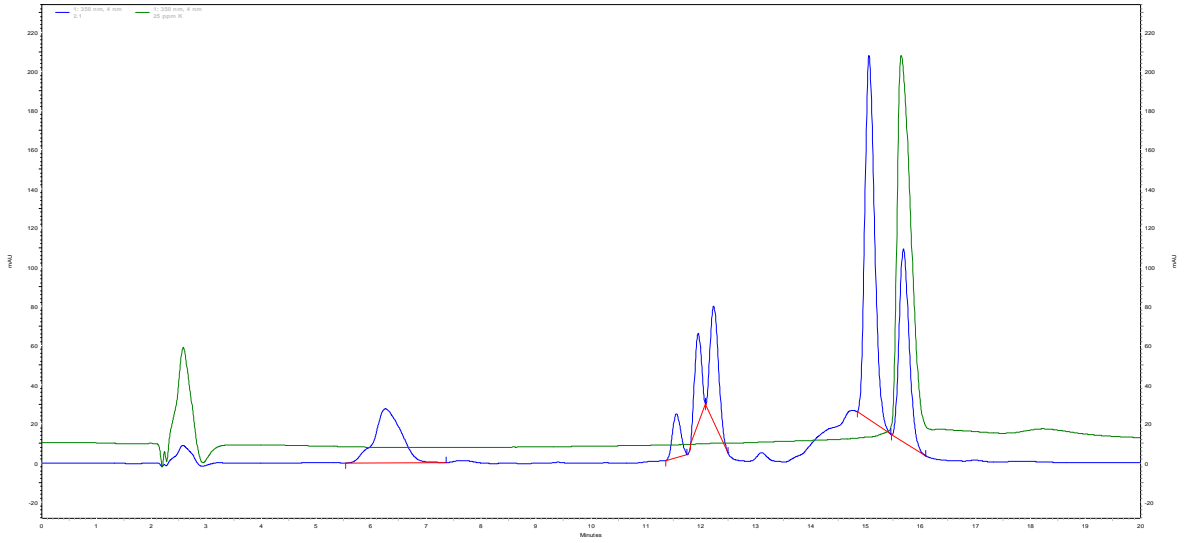
Şekil 43. Tablo 7' deki verilere göre hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi

3.8.1. Çözücü Hacmi Optimizasyon Çalışmalarının HPLC Analizleri

Çözücü hacmi optimizasyonu için yapılan çalışmaların kantitatif verileri ayrı ayrı analizler ile belirlendi. Bir örnek olması amacıyla 200 mL 95:5 metanol-su karışımlarıyla ekstre edilen örneğin kromatogramı Şekil 44' de verilmiştir. HPLC analizleri ile ekstrakt içinde ve tohumdan elde edilen kolşisin yüzdeleri Tablo 13' de görülmektedir.

Tablo 13. Çözücü hacmi optimizasyon çalışmalarının HPLC sonuçları

Çözücü hacmi (mL)	Tohum kütlesi (g)	Ekstrakt kütlesi (g)	Kolşisin pik alanı (mAU)	Kolşisin kütlesi (g)	Kolşisin yüzdesi (%)
100	8	0,24	5026022	0,01	0,19
150	8	0,25	4834830	0,01	0,19
200	8	0,33	4470379	0,02	0,21
250	8	0,34	3494200	0,01	0,21
300	8	0,33	3897895	0,0147	0,18
				Ortalama	0,20



Şekil 44. Çözücü hacmi optimizasyonu için yapılan ekstraksiyonların standart ile birlikte HPLC Kromatogramı (200 mL 95:5 MeOH-su karışımı 24 saat çalkalama süresi)

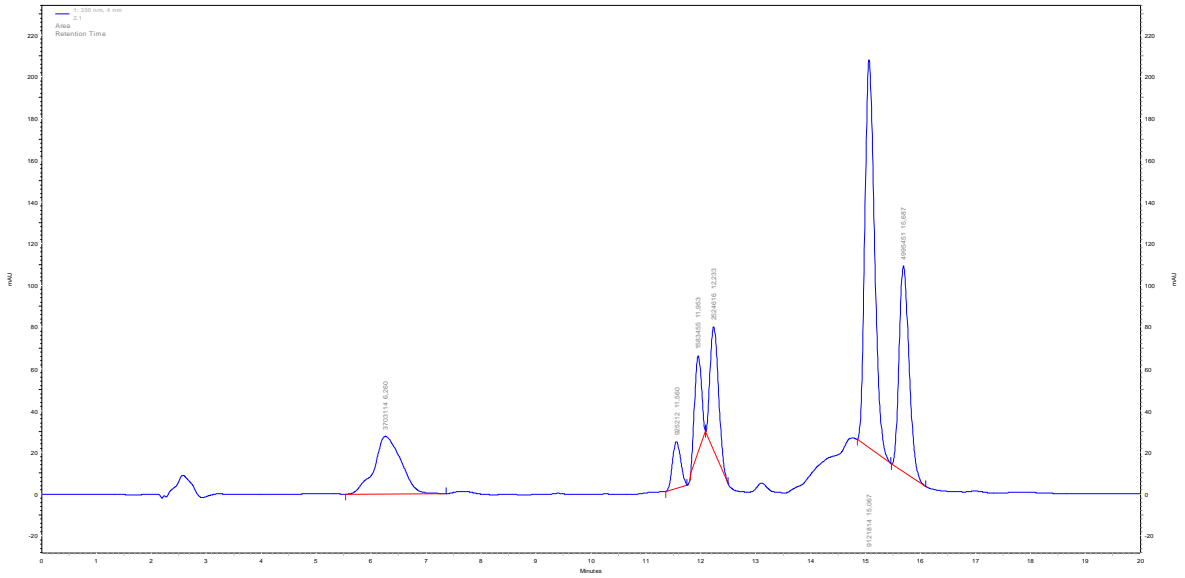
Diğer piklerin standartları olmadığından dolayı piklerin kantitatif hesaplamaları yapılamadı. İlgili standartlar temin edildiği takdirde pik alanları bilindiğinden hesaplamalar yapılacaktır.

3.8.2. Çalkalama Süresi Optimizasyon Çalışmalarının HPLC Sonuçları

En uygun çalkalama süresinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların HPLC kromatogramı Şekil 45' de ve sonuçları Tablo 14' de verilmiştir.

Tablo 14. En uygun çalkalama süresinin belirlenmesi deneylerinin HPLC sonuçları

Çalkalama süresi (sa)	Tohum kütlesi (g)	Ekstrakt kütlesi (g)	Kolşisin pik alanı (mAU)	Kolşisin kütlesi (g)	Kolşisin yüzdesi (%)
1	8	0,23	5195451	0,01	0,17
2	8	0,26	5183138	0,02	0,19
3	8	0,27	4819079	0,01	0,18
4	8	0,27	5341161	0,02	0,20
5	8	0,29	4695127	0,02	0,19
6	8	0,29	5073498	0,02	0,21
12	8	0,29	5809908	0,0	0,23
Ortalama					0,20



Şekil 45. En uygun çalkalama süresi belirleme deneylerinin HPLC kromatogramı

Bu çalışmalar sonucunda bitki tohumunun içeriğinde ortalama %0,2 kolşisin içeriği tespit edilmiştir. Diğer maddelerin standartları mevcut olmadığından kantitatif hesaplamalar yapılamamıştır.

3.8.3. SFE Çalışmalarının HPLC Analizleri

Modifiyersiz yapılan ekstraksiyondan elde edilen veriler (Tablo 15) ve modifiyerli yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen veriler (Tablo 16) aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 15. Modifiyersiz SFE ekstraksiyonunun HPLC sonuçları

Ekstraksiyon Süresi (sa)	Kullanılan tohum kütlesi (g)	Kolşisin kütlesi (g)	Kolşisin yüzdesi (%)
1	10,80	0,0005	<0,001
3	10,80	0,0005	<0,001
5	10,80	0,0005	<0,001

Tablo 16. Modifiyerli SFE ekstraksiyonunun HPLC sonuçları

Modifiyer Miktarı (mL)	Kullanılan tohum miktarı (g)	Kolşisin kütlesi (g)	Kolşisin yüzdesi (%)
0,06	10,80	0,0016	0,01
0,2	10,80	0,0027	0,03
0,3	10,80	0,0080	0,07
0,4	10,80	0,0130	0,12
0,5	10,80	0,0211	0,20
0,6	10,80	0,0190	0,18

Bu sonuçlar doğrultusunda modifiyersiz SFE işlemi sonucunda, elde edilen ekstraktların kayda değer miktarlarda kolşisin içermediği gözlemlenmiştir. 0,5 mL/dk metanol modifiyerli 5 saatlik ekstraksiyon işlemi sonucu ise elde edilen ekstrakt miktarını az olmasına rağmen, ekstre edilen kolşisin miktarının sıvı ekstraksiyonlarda elde edilen en yüksek kolşisin yüzdesi ile hemen hemen aynı olduğu gözlemlenmiştir. Bu yöntem ile kolşisin ve izomeri seçici olarak ekstre edilebildiğinden ve kolşikosidin hiç ekstrakta geçmemesinden dolayı, bu yöntemin sıvı ekstraksiyonuna göre daha avantajlı olduğu açıktır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma Türkiye' den yurt dışına ihraç edilen bazı *Colchicum* cinsi tohumlarının içeriğindeki kolşisin alkaloidinin ülkemizde de izole edilebileceği kolay bir ekstraksiyon ve izolasyon yöntemi geliştirmek için yapılmıştır.

Çözücü hacmi optimizasyon çalışmaları yapılmış ve bu ekstraksiyon işlemleri sonucunda 200 mL 95:5 metanol-su oranında yapılan ekstraksiyon sonucu en yüksek verim elde edilmiştir. Daha sonra, en uygun çalkalama süresini belirleme deneyleri yapılmış ve 5 saatlik bir çalkalama süresi ve bu süreye ek 30 dakika ultrasonik banyo ekstraksiyonu ile en uygun ekstraksiyon parametreleri belirlenmiştir. Tohumların içeriğindeki kolşisin miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen (Tanker, vd., 1994), bu çalışmalar tohumdan elde edilen ham ekstrakt içindeki kolşisinin miktarının kantitatif analizi ile sınırlı kalmıştır. Bu tohumlardan alkaloidlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için yeni bir yöntem geliştirilmesi işlemi ilk kez bu çalışmada yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen ham tohum ekstraktlarının içeriğindeki kolşisin varlığı İTK' da, HPLC' de belirlenmiştir. Yapılan HPLC analizleri sonucunda tohumların içerisinde ortalama %0,2 kolşisin var olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç literatür ile uyumludur (Tanker, vd., 1994).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu denemeleri yapılmış olup en uygun parametre belirlenmeye çalışılmıştır. Modifiyer olarak metanolün kullanıldığı 5 saatlik, 0,5 mL/dk'lık metanol modifiyerli ekstraksiyon en uygun SFE şartları olarak belirlenmiştir. SFE işlemi sonucu elde edilen ham ekstrakt miktarı sıvı ekstraksiyona göre düşük olmasına rağmen, kolşisin içeriği bakımından birbiriyle uyumludur. Yapılan HPLC analizlerinde, SFE işlemi sonucu %0,2 kolşisin içeren ham karışım elde edilmiştir. Bu yöntem ile kolşisin ve izomeri seçici olarak ekstre edilebildiğinden ve kolşikosidin hiç ekstrakta geçmemesinden dolayı, bu yöntemin sıvı ekstraksiyonuna göre daha avantajlı olduğu açıktır. Bu yöntemin dezavantajı ise sıvı ekstraksiyondaki gibi, kullanılan CO₂' nin geri kazanılamamasıdır. SFE yöntemi kullanılarak daha büyük kütleli tohumdan kolşisinin ekstraksiyonu ve ekstraksiyon öncesinde yağın petrol eteri ile uzaklaştırılmasına yönelik çalışmalar ilk kez bu tez kapsamında yapılmıştır.

Kolşisini bitkiden saf olarak elde etmek için bir seri kolon işlemleri yapıldıysa da, tanımlanamadığımız ancak kolşisinin bir izomeri olarak düşündüğümüz madde kolşisin ile birlikte kolondan ayrıldığı için kolşisin kolondan saf olarak elde edilememiştir.

Sadece ham karışımın elde edilebildiği geleneksel ekstraksiyon ve SFE ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir.

Bilindiği gibi ihracatı yapılan tohumlar çok düşük fiyatlarda satılmaktadır. Bu çalışmanın hedefine alternatif olarak, tohumların içerisindeki ham karışım ekstrakte edilip katma değeri daha yüksek bir ürün olarak ihracatının yapılması düşünülebilir. İlerleyen çalışmalarda izomeri olduğunu düşündüğümüz tanımlanamayan pik ile kolşisinin ayrılması için kiral kolon dolgu maddesi kullanılıp kolon işlemi uygulanabilir.

Ayrıca tohumda yaklaşık %8 oranında sabit yağ saptanmıştır. Bu yağın, sabun endüstrisinde, kozmetik endüstrisinde veya biyodizel yapımında kullanımı, tohumların asıl kullanım amacının yanında, katma değeri olan alternatif bir ürün olarak değerlendirilmesi düşünülebilir.

5. KAYNAKLAR

- Akan, H. ve Eker, İ., 2005. Check-List of the Genus *Colchicum* in the Flora of Turkey. Turkish Journal of Botany, 29, 327-331.
- Aktaş, Z. ve Olcay A., 1996. Supercritical Toluene Extraction of a Reduced Turkish Lignite, Fuel Processing Technology, 48, 1, 61-72.
- Allender, W.J., 1982. Colchicine poisoning as a mode of suicide, J. Forensic Sci, 27, 944-947.
- Angelico, M., Cepparulo, M., Barlattani, A., Liuti, A., Gentile, S., Hurtova, M., Ombres, D., Guarascio, P., Rocchi, G. ve Angelico, F., 2000. Unfavourable effects of colchicine in combination with interferon-alpha in the treatment of chronic hepatitis C, Aliment Pharmac. Ther., 14, 1459-1467.
- Arai, Y., Sako, T. ve Takebayashi, Y., 2002. Supercritical Fluids Molecular Interactions, Physical Properties and New Applications, Springer Series.
- Balduini, W., Cimino, M., Depoortere, H. ve Cattabeni, F., 1999. Characterisation of [H-3]-thiocolchicoside binding sites in rat spinal cord and cerebral cortex, Eur. J. Pharmac., 376, 149-157.
- Barnabas, B., Obert, B. ve Kovacs, G., 1999. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero, Plant Cell Rep., 18, 858-862.
- Başer, K. H. C., 2000. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c23/CI011069.pdf>.
- Baytop, T., 1963. Türkiye'nin Zehirli ve Tıbbi Bitkileri, İstanbul.
- Baytop, T., 1984. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. İ.Ü. Ecz. Fak. Yay. No: 3255/40, İstanbul, 480 s.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 3.
- Beckman, E.J., 2004. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, J. of Supercritical Fluids, 28, 121-191.
- Beejmohun, J., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. ve Mesnard, F., 2007. Microwave-Assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed, Phytochemical Analysis, 18, 275-282.
- Bernhoft A., 2010. A brief review on bioactive compounds on plants, Bioactive compounds in plants-benefits and risks form an and animals, The Norwegian academy of science and letters symposium, Oslo, 13-14 Kasım, ISBN 978-82-7099-583-7.

- Box, G.E.P, ve Wilson, K.G., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions, Journal of Royal Statistical Society 13, 1-45.
- Boye, O. ve Brossi, A., 1992. The Alkaloids; Brossi, A., Cordell, G.A., Eds., Academic Pressi, New York, Vol. 41, 125-178.
- Brickell, C.D., 1984. Colchicum L. P.H. Davis, R.R. Mill and Kit Tan. Flora of Turkey and the East Aegean Island. Edinburgh University Press. Cilt VIII, 632 s. Edinburgh.
- Brossi, A., 1990. Bioactive Alkaloids. 4. Results of Recent Investigations with Colchicine and Physostigmine. J. Med. Chem., 33, 2311-2319.
- Brunner, G., 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing, Journal of Food Engineering, 67, 21–33.
- Çalimli, A., 2003. Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara, 96.
- Cansel, F., Aymonier, C. ve Loppinet-Serani, A., 2003. Review on Materials Science and Supercritical Fluids, Current Opinion in Solid State and Materials Science, 7, 331–340.
- Capraro, H.G. ve Brossi, A., 1984. The Alkaloids, Brossi, A., Ed., Academic Press, New York, Vol. 23, 1-70.
- Cavazza, M., Nucci, L., Pannocchia, E., Pardi, L., Pergola, F., Pinzino, C. ve Pietra, F., 1999. Colchicine red-ox chemistry revisited: cathodic behaviour and EPR observation of an intermediate radical anion, Tetrahedron, 55, 11601-11608.
- Chaudhuri, P.K. ve Thakur, R.S., 1994 Curr. Res. Med. Aromatic Plants., 16, 1, 51.
- Clifford, T., 1999. Fundamentals of Supercritical Fluids, Oxford Science Publications, Chapter 5, NewYork.
- Corrodi, H. ve Hardegger, E., 1955. Die Konfiguration des colchicins und verwandter VerbindungenHelv, Chem. Acta, 38, 2030-2033.
- Coşkun, M., Özden, S., Koyuncu, M., Tanker, M., Güvenç, A., Soner, O., Akalın, K., Altun, L. ve Erdurak, C.S., 2000. The importance of colchicine and the studies on obtaining colchicine from the *Colchicum* species growing in Turkey. The 47 th Annual Meeting of Japanese Society of Pharmacognosy, Tokyo-Japonya, 7-8 Eylül.
- Coşkun, M. ve Özkan, A. M. G., 2005. Global phytochemistry: The Turkish Frame. Phytochemistry, 66, 956-960.
- Cowan, M. M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents, Clinical Microbiology Reviews, 12, 4, 564–582.

- Danel, V.C., Wiart, J.F., Hardy, G.A., Vincent, F.H. ve Houdret, N.M., 2001. Self-poisoning with *Colchicum autumnale* L. flowers, J. Toxicol Clin. Toxicol, 39, 4, 409-411.
- Davis, P. H., 1984. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.8, University Press, Edinburgh.
- Deveaux, M., Hubert, N. ve Demarly, C., 2004. Colchicine poisoning: case report of two suicides. Forensic Sci. Int., 143(Suppl. 2e3), 219-222.
- Dinçer, S., Akgün, N., Akgün, M. ve Akgerman, A., 1998. An Overview of Supercritical Fluid Extraction, Proc., World Conference and Exhibition on 134 Oilseed and Edible Oils Processing: Emerging Technologies, Current Practices, Quality Control, Technology Transfer and Environmental Issues, 235-242, Illinois, USA.
- Ellington, E., Bastida, J., Viladomat, F. and Codina, C., 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of colchicine and related alkaloids from seeds of *Colchicum autumnale* L., Phytochemical Analysis 14, 164-169.
- Ellwood, M.G. ve Robb, G.H., 1971. Self-poisoning with colchicine, Postgrad Med. J., 47, 129-131.
- Erte, E., 2007. Siyah üzümde (*Vitis vinifera* L.) bulunan Resveratrol'ün üretim veriminin artırılmasına ses ötesi dalgaların etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fakhari, A. R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S. N. ve Haddad, P. R., 2005. Hydrodistillation-Headspace Solvent Microextraction, A New Method for Analysis of the Essential Oil Components of *Lavandula angustifolia* Mill., J.of Chromatography A., 1098, 14-18.
- Ghaderi, R., 2000. A supercritical fluids extraction process for the production of drug loaded biodegradable microparticles, Comprehensive Summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Pharmacy, Acta Universitatis Upsaliensis, 234-246.
- Güvenç, A., Coşkun, M. ve Koyuncu, M., 1998. The characteristics of the seeds of *colchicum* (Liliaceae) species, FABAD J.Pharm. Sci., 23, 53-59.
- Goldfinger, S.E., 1972. Colchicine for familial Mediterranean fever, J. Med., 287, 130.2
- Halliday, D. ve Resnic, R., 1992. Fiziğin Temelleri-1, Çeviren Prof. Dr. Cengiz Yalçın, 3. Basım, 368-369.
- Harborne, J.B. ve Williams, C.A., 1971. 6-Hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants, Phytochemistry, 10, 367-378.
- Joshi, C.S., Priya, E.S. ve Mathela, C.S., 2010. Isolation and anti-inflammatory activity of colchicinoids from *Gloriosa superba* seeds, Pharmaceutical Biology, 48, 2, 206-209.

- Kannan, S., Wesley, S. D., Ruba, A., Rajalakshmi, A. R. ve Kumaragurubaran, K., 2007. Optimization of solvents for effective isolation of colchicines from *Gloiosa superba* L. seeds, Natural Product Research 21, 5, 469-472.
- Katzung, B.G., 1995. Basic and Clinical Pharmacology; B.G. Katzung, Ed., Apleton ve Lange, Norwalk, 536-559.
- Kershenobich, D., Varga, F., Garcia Tao, G., Tamayo, R.P., Gent, M. ve Rojkind, M., 1988. Colchicine in the threatment of cirrhosis of the liver, N. Engl. J. Med., 318, 1709-1713.
- Kılıç, A., 2008. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri, Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 10, 13, 37-45.
- Kints, P., Jamey, C., Tracqui, A. ve Mangin, P., 1997. Colchicine poisoning: report of a fatal case and presentation of an HPLC procedure for body fluid and tissue analyses, J. Anal. Toxicol., 21, 1, 70-72.
- Klintschar, M., Beham-Schmidt, C., Radner, H., Henning, G. ve Roll, P., 1999. Colchicine poisoning by accidental ingestion of meadow saffron (*Colchicum autumnale*): pathological and medicolegal aspects, Forensic Sci. Int., 106: 191-200.
- Larrubia, M.Y., Villamanan, B.E., Jimenez-Caballero E., Diazaraque, M.R., Lucendo, V.A. ve Fernandez-Capitan, C., 2003. Suicidal attempt with colchicine, Farm. Hosp., 27, 3, 188-190.
- Lepilleur, C., Beckman, E.J., Schonemann, H. ve Krukoniş V.J., 1997. Effect of Molecular Architecture on the Phase Behavior of Fluoroether-Functional Graft Copolymers in Supercritical CO₂, Fluid Phase Equilibria, 134, 285-305.
- Linskens, H.F. ve Jackson, J.F., 1997. Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 12, Essential Oils and waxes, Springer, Germany.
- McHugh, M.A. ve Krukoniş, V.J., 1986. Supercritical Fluid Extraction, Butterworths, Boston/USA.
- Milne, S.T. ve Meek, P.D., 1998. Fatal colchicine overdose: report of a case and review of the literature, Am. J. Emerg. Med., 16, 6, 603-608.
- Mons, S., Veretout, F., Carlier, M.F., Erk, I., Lepault, J., Trudel, E., Salesse, C., Ducray, P., Mioskowski, C. ve Lebeau, L., 2000. The interaction between lipid derivatives of colchicine and tubulin: consequences of interaction of the alkaloid with lipid membranes, Biochem Biophys Acta, 1468, 381-395.
- Mukhopadhyay, M., 2000. Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide, CRC Press.
- Noon, S. M., 2007. Mass Transfer Of Near Critical Carbon Dioxide In Poly (Methyl Methacrylate), The Ohio State University, 35.

- Oakes, R.S., Clifford, A.A. ve Rayner, C.M., 2001. The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 917–941.
- Özkal, S.G., 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of apricot kernel, ODTÜ, Ankara, 140-168.
- Pandey, D.K. ve Banik, R.M., 2012. Optimization of extraction conditions for colchicine from *Gloriosa superba* tubers using response surface methodology, Journal of Agricultural Technology 8, 4, 1301-1315.
- Paulsen, B.S., 2010. Highlights through the history of plant medicine, Bioactive compounds in plants-benefits and risks form an and animals, The Norwegian academy of science and letters symposium, Oslo, 13-14 Kasım, ISBN 978-82-7099-583-7.
- Pelletier, P.S. ve Caventon, J., 1820. (Başlık bilinmiyor), Ann. Chim. Phys., 14, 69.
- Reverchon, E. ve Marco, I.D., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, Journal of Supercritical Fluids, 38, 146–166.
- Roberts, W.N., Liang, M.H. ve Stern, S. H., 1987. Colchicine in acute gout: reassessment of risks and benefits, J. Am. Med. Assoc., 257, 1920-1922.
- Sanal, S., 2004. Süperkritik CO₂ ile kayısı posasından β-karoten ekstraksiyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V. ve Huopalahti, R., 1999. Advances in supercritical carbon dioxide technologies, Trends in Food Science & Technology, 10, 217-222.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Edt. Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bölüm 7, Sekonder Metabolit Üretimi. Selçuk Üniversitesi VakfıYayınları, Konya, 211-261.
- Sun, Y.P., 2002. Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Syntheses, Properties, and Applications, New York, USA.
- Sunol, A.K. ve Beyer, G.H., 1990. Mechanism of Supercritical Extraction of Coal, Industrial & Engineering Chemistry Research, 29, 5, 842-849.
- Sussman, J.S., Brozena, S.C., Skop, N., Korecka, M. ve Shaw, L.M., 2004 Accidental intravenous colchicine poisoning, Ther. Drug Monit., 26, 6, 688-692.
- Şanal, İ.S., 2004. Süperkritik CO₂ ile kayısı posasından β-karoten ekstraksiyonu, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 1985. Uçucu yağlar, Farmakognozi Cilt 2, Ankara Üniversitesi.

- Tanker, M., Koyuncu, M. ve Coşkun M., 1994. Türkiye'de yetişen bazı *colchicum* türlerinin kolşisin ve kolşikozit yönünden incelenmesi, TÜBİTAK TBAG-1138 nolu proje, Ankara.
- Tanker, M., Koyuncu, M, Coşkun, M. ve Altun, L., 1995. Determination of colchicoside and colchicine in some *Colchicum* species, 4 th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, June 27-30, Ankara University, Faculty of Pharmacy, Ankara-Turkey, Abstracts Book O-5.
- Tanker, M., Coşkun, M., Ozden, S., Koyuncu, M., Güvenç, A., Soner, O., Altun, L., Akalın, K. ve Erdurak, C.S., 2000. Ülkemizde yetişen *colchicum* türlerinden tedavide kullanılmak amacıyla standart *colchicum* tohumu ekstresinin hazırlanması ve kolşisin elde edilmesi, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No. 97-03-00-01, Ankara.
- Taylor, L.T., 1996. Supercritical Fluid Extraction, A Wiley-Interscience Publication, New York.
- Tomasko, D.L. ve Guo, Z., 2006. Supercritical Fluids, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons.
- URL-1, http://tr.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_ekstrakt%C3%B6r%C3%BC. 01 Nisan 2014
- URL-2, <http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicum>. 23 Şubat 2014
- URL-3, <http://www.agaclar.net/forum/karadeniz-bolgesi/3425.htm>. 01 Nisan 2014
- URL-4, http://www.frik.com.tr/tur/urunler/urunler.aspx?grp_kod=1. 29 Mart 2014
- URL-5, <http://www.ilacinfo.com/kolsin-draje,8699508120253,3907.html>. 29 Mart 2014.
- URL-6, http://www.alibaba.com/product-detail/meadow-saffron-extract-colchicine-powder_1684434940.html. 29 Mart 2014
- URL-7, http://trustedshoplive.info/products/general_health/colchicine/order/, 29Mart 2014.
- Voet, D. ve Voet. J.G., 1990. Biochemistry John Wiley and Sons, Inc., New York, 758-762.
- Wang, L. ve Weller, C.L., 2006. Recent advanced in extraction of nutraceuticals from plants, Trends in Food Science & Technology, 17, 300-312.
- Weakley-Jones, B., Gerber, J.E. ve Biggs, G., 2001. Colchicine poisoning: case report of two homicides, Am. J. Forensic Med. Pathol., 22, 2, 203-206.
- Weede, R.P., 1984. Poison in the Pot: The Legacy of Lead Southern Illinois University Press, Carbondale and Edwardsville, 83.
- Wijesekera, R.O.B., 1993. Practical manual on the essential oils industry, agrotechnology, Processing, Quality Assesment, UNIDO, 100-121.

Wildman, W.C., 1960. The Alkaloids, Manske, R.H.F., Ed., Academic Press: New York, Vol.6, 220-246.

Williams, S., 2002. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, AOAC Publications, Arlington, A.B.D.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul’ da doğdu. Lise öğrenimini İstanbul Barbaros Lisesi’ nde tamamladıktan sonra 2007 yılında Trabzon Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandı. 2012 yılında Kimya Bölümünü 1. olarak bitirerek kimyager ünvanını aldı. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’ nda Yüksek Lisans öğrenimine hak kazandı.